

**DER MITTLERE AKTIVITÄTSKOEFFIZIENT VON
EINFACHEN KALIUMSALZEN IN KONZENTRIERTEN
RINDERHÄMOGLOBINLÖSUNGEN**

von

WOLFGANG HERMANN SCHMID

aus

SCHMIDMÜHLEN

1976 # 399



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546221_0079

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

DER MITTLERE AKTIVITÄTSKOEFFIZIENT VON EINFACHEN KALIUMSALZEN IN KONZENTRIERTEN RINDERHÄMOGLOBINLÖSUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
WOLFGANG HERMANN SCHMID
aus
SCHMIDMÜHLEN

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 1976

1. Einleitung	1
2. Die Entstehung der Kunst	2
3. Die Entwicklung der Kunst	3
4. Die Kunst der Antike	4
5. Die Kunst des Mittelalters	5
6. Die Kunst der Renaissance	6
7. Die Kunst des Barock	7
8. Die Kunst des 18. Jahrhunderts	8
9. Die Kunst des 19. Jahrhunderts	9
10. Die Kunst des 20. Jahrhunderts	10
11. Die Kunst der Zukunft	11
12. Die Kunst der Gegenwart	12
13. Die Kunst der Vergangenheit	13
14. Die Kunst der Zukunft	14
15. Die Kunst der Gegenwart	15
16. Die Kunst der Vergangenheit	16
17. Die Kunst der Zukunft	17
18. Die Kunst der Gegenwart	18
19. Die Kunst der Vergangenheit	19
20. Die Kunst der Zukunft	20
21. Die Kunst der Gegenwart	21
22. Die Kunst der Vergangenheit	22
23. Die Kunst der Zukunft	23
24. Die Kunst der Gegenwart	24
25. Die Kunst der Vergangenheit	25
26. Die Kunst der Zukunft	26
27. Die Kunst der Gegenwart	27
28. Die Kunst der Vergangenheit	28
29. Die Kunst der Zukunft	29
30. Die Kunst der Gegenwart	30
31. Die Kunst der Vergangenheit	31
32. Die Kunst der Zukunft	32
33. Die Kunst der Gegenwart	33
34. Die Kunst der Vergangenheit	34
35. Die Kunst der Zukunft	35
36. Die Kunst der Gegenwart	36
37. Die Kunst der Vergangenheit	37
38. Die Kunst der Zukunft	38
39. Die Kunst der Gegenwart	39
40. Die Kunst der Vergangenheit	40
41. Die Kunst der Zukunft	41
42. Die Kunst der Gegenwart	42
43. Die Kunst der Vergangenheit	43
44. Die Kunst der Zukunft	44
45. Die Kunst der Gegenwart	45
46. Die Kunst der Vergangenheit	46
47. Die Kunst der Zukunft	47
48. Die Kunst der Gegenwart	48
49. Die Kunst der Vergangenheit	49
50. Die Kunst der Zukunft	50
51. Die Kunst der Gegenwart	51
52. Die Kunst der Vergangenheit	52
53. Die Kunst der Zukunft	53
54. Die Kunst der Gegenwart	54
55. Die Kunst der Vergangenheit	55
56. Die Kunst der Zukunft	56
57. Die Kunst der Gegenwart	57
58. Die Kunst der Vergangenheit	58
59. Die Kunst der Zukunft	59
60. Die Kunst der Gegenwart	60
61. Die Kunst der Vergangenheit	61
62. Die Kunst der Zukunft	62
63. Die Kunst der Gegenwart	63
64. Die Kunst der Vergangenheit	64
65. Die Kunst der Zukunft	65
66. Die Kunst der Gegenwart	66
67. Die Kunst der Vergangenheit	67
68. Die Kunst der Zukunft	68
69. Die Kunst der Gegenwart	69
70. Die Kunst der Vergangenheit	70
71. Die Kunst der Zukunft	71
72. Die Kunst der Gegenwart	72
73. Die Kunst der Vergangenheit	73
74. Die Kunst der Zukunft	74
75. Die Kunst der Gegenwart	75
76. Die Kunst der Vergangenheit	76
77. Die Kunst der Zukunft	77
78. Die Kunst der Gegenwart	78
79. Die Kunst der Vergangenheit	79
80. Die Kunst der Zukunft	80
81. Die Kunst der Gegenwart	81
82. Die Kunst der Vergangenheit	82
83. Die Kunst der Zukunft	83
84. Die Kunst der Gegenwart	84
85. Die Kunst der Vergangenheit	85
86. Die Kunst der Zukunft	86
87. Die Kunst der Gegenwart	87
88. Die Kunst der Vergangenheit	88
89. Die Kunst der Zukunft	89
90. Die Kunst der Gegenwart	90
91. Die Kunst der Vergangenheit	91
92. Die Kunst der Zukunft	92
93. Die Kunst der Gegenwart	93
94. Die Kunst der Vergangenheit	94
95. Die Kunst der Zukunft	95
96. Die Kunst der Gegenwart	96
97. Die Kunst der Vergangenheit	97
98. Die Kunst der Zukunft	98
99. Die Kunst der Gegenwart	99
100. Die Kunst der Vergangenheit	100
101. Die Kunst der Zukunft	101
102. Die Kunst der Gegenwart	102
103. Die Kunst der Vergangenheit	103
104. Die Kunst der Zukunft	104
105. Die Kunst der Gegenwart	105
106. Die Kunst der Vergangenheit	106
107. Die Kunst der Zukunft	107
108. Die Kunst der Gegenwart	108
109. Die Kunst der Vergangenheit	109
110. Die Kunst der Zukunft	110
111. Die Kunst der Gegenwart	111
112. Die Kunst der Vergangenheit	112
113. Die Kunst der Zukunft	113
114. Die Kunst der Gegenwart	114
115. Die Kunst der Vergangenheit	115
116. Die Kunst der Zukunft	116
117. Die Kunst der Gegenwart	117
118. Die Kunst der Vergangenheit	118
119. Die Kunst der Zukunft	119
120. Die Kunst der Gegenwart	120
121. Die Kunst der Vergangenheit	121
122. Die Kunst der Zukunft	122
123. Die Kunst der Gegenwart	123
124. Die Kunst der Vergangenheit	124
125. Die Kunst der Zukunft	125
126. Die Kunst der Gegenwart	126
127. Die Kunst der Vergangenheit	127
128. Die Kunst der Zukunft	128
129. Die Kunst der Gegenwart	129
130. Die Kunst der Vergangenheit	130
131. Die Kunst der Zukunft	131
132. Die Kunst der Gegenwart	132
133. Die Kunst der Vergangenheit	133
134. Die Kunst der Zukunft	134
135. Die Kunst der Gegenwart	135
136. Die Kunst der Vergangenheit	136
137. Die Kunst der Zukunft	137
138. Die Kunst der Gegenwart	138
139. Die Kunst der Vergangenheit	139
140. Die Kunst der Zukunft	140
141. Die Kunst der Gegenwart	141
142. Die Kunst der Vergangenheit	142
143. Die Kunst der Zukunft	143
144. Die Kunst der Gegenwart	144
145. Die Kunst der Vergangenheit	145
146. Die Kunst der Zukunft	146
147. Die Kunst der Gegenwart	147
148. Die Kunst der Vergangenheit	148
149. Die Kunst der Zukunft	149
150. Die Kunst der Gegenwart	150
151. Die Kunst der Vergangenheit	151
152. Die Kunst der Zukunft	152
153. Die Kunst der Gegenwart	153
154. Die Kunst der Vergangenheit	154
155. Die Kunst der Zukunft	155
156. Die Kunst der Gegenwart	156
157. Die Kunst der Vergangenheit	157
158. Die Kunst der Zukunft	158
159. Die Kunst der Gegenwart	159
160. Die Kunst der Vergangenheit	160
161. Die Kunst der Zukunft	161
162. Die Kunst der Gegenwart	162
163. Die Kunst der Vergangenheit	163
164. Die Kunst der Zukunft	164
165. Die Kunst der Gegenwart	165
166. Die Kunst der Vergangenheit	166
167. Die Kunst der Zukunft	167
168. Die Kunst der Gegenwart	168
169. Die Kunst der Vergangenheit	169
170. Die Kunst der Zukunft	170
171. Die Kunst der Gegenwart	171
172. Die Kunst der Vergangenheit	172
173. Die Kunst der Zukunft	173
174. Die Kunst der Gegenwart	174
175. Die Kunst der Vergangenheit	175
176. Die Kunst der Zukunft	176
177. Die Kunst der Gegenwart	177
178. Die Kunst der Vergangenheit	178
179. Die Kunst der Zukunft	179
180. Die Kunst der Gegenwart	180
181. Die Kunst der Vergangenheit	181
182. Die Kunst der Zukunft	182
183. Die Kunst der Gegenwart	183
184. Die Kunst der Vergangenheit	184
185. Die Kunst der Zukunft	185
186. Die Kunst der Gegenwart	186
187. Die Kunst der Vergangenheit	187
188. Die Kunst der Zukunft	188
189. Die Kunst der Gegenwart	189
190. Die Kunst der Vergangenheit	190
191. Die Kunst der Zukunft	191
192. Die Kunst der Gegenwart	192
193. Die Kunst der Vergangenheit	193
194. Die Kunst der Zukunft	194
195. Die Kunst der Gegenwart	195
196. Die Kunst der Vergangenheit	196
197. Die Kunst der Zukunft	197
198. Die Kunst der Gegenwart	198
199. Die Kunst der Vergangenheit	199
200. Die Kunst der Zukunft	200

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Methodik	5
2.1	Theorie der Messung	5
2.1.1	Messung der EMK mit Membranelektroden	5
2.1.2	Bestimmung der mittleren Aktivität	12
2.2	Herstellung der Hämoglobin-Salz-Lösung	13
2.2.1	Hämoglobin-Stammlösung	13
2.2.2	Entsalzen der Hämoglobin-Stammlösung	14
2.2.3	Aufkonzentrieren der Hämoglobin-Stammlösung	14
2.3	Analyse der Hämoglobin-Salz-Lösung	16
2.3.1	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	16
2.3.2	Messung des pH-Wertes	17
2.3.3	Gelfiltration	17
2.3.4	Salzeinwaage	18
2.4	Messung der mittleren Aktivität	20
2.4.1	Meßaufbau	20
2.4.2	Meßzelle	20
2.4.3	Ionenaustauschermembranen	23
2.4.4	Elektroden und Salzbrücken	24
2.4.5	Titrationlösungen	24
2.4.6	Meßvorgang	25
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient	33

3.2	Die Protein-Wasser-Wechselwirkung	38
3.3	Deutung der Ergebnisse als spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinelektrolyt	45
4	Fehlerbetrachtung	53
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung und Problemstellung

Das Zytoplasma setzt sich im wesentlichen zusammen aus Wasser (70 - 80 Gew.%), Proteinen (10 - 20 Gew.%) und anorganischen Stoffen, vorwiegend Salzen in dissoziierter Form, wie K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- und HCO_3^- (1 - 2 Gew.%). Von der Molekühlzahl her, trotz des geringen Gewichtsanteils, sind die Salze im Zytoplasma ein wichtiger Bestandteil. Die Konzentration der Ionen einfacher Salze beträgt in allen bekannten tierischen und pflanzlichen Zellen 0,1 - 0,3 Moll pro kg Zellwasser.

Um Funktionen der Zelle zu deuten ist es notwendig, Kenntnisse über chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Zytoplasmas und der darin enthaltenen Komponenten zu besitzen.

Nach der chemischen Zusammensetzung kann man annehmen, daß der physikalisch-chemische Zustand des Zytoplasmas durch die Wassermoleküle, die Protein-Polyionen und die kleinen Salzionen und ihre Wechselwirkung bestimmt werden. Für den physikalisch-chemischen Zustand des Zytoplasmas gibt es zwei gegensätzliche Modelle:

Einmal ist es möglich, das Zytoplasma als wässrige Lösung von Makromolekülen und Salzen aufzufassen, zum anderen existiert das Modell des stark strukturierten und festkörperähnlichen Zytoplasmas von LING [22-25] und TROSCHEIN [52]. Sie schreiben in der "association induction" - Hypothese bzw. Sorptionstheorie den Makromolekülen im Zellwasser hohes Wasserbindungsvermögen zu, das den kleinen Ionen Lösungswasser entzieht und sie weitgehend fixiert. Das müßte für die Salze des Zytoplasmas eine star-

ke Erniedrigung des chemischen Potentials bedeuten, was aber bisher in hochkonzentrierten Proteinlösungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Andere Untersuchungen, wie die Messung der intrazellulären Leitfähigkeit mit hochfrequentem Wechselstrom durch PAULY [32-36], der Diffusionsgeschwindigkeit kleiner Ionen und Moleküle in der Zelle [8, 21] oder der kalorischen Eigenschaften des Zellwassers [4, 29, 19], beschreiben das Zytoplasma als wässrige Lösung von Proteinen und Salzen.

Der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit liegt daher die Annahme zugrunde, daß die bestimmenden Wechselwirkungen der Komponenten, insbesondere eine Bindung von Salzionen, sich auch in konzentrierten Protein - Salz - Lösungen als Zytoplasmamodelle finden müssen.

Bisherige Untersuchungen in Zytoplasmamodelllösungen, die aus konzentrierten Protein - Salz - Lösungen bestanden, zeigten, daß zwar Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten auftreten, diese jedoch selbst bei hohen Proteinkonzentrationen nur gering gegenüber denen in reinen Salzlösungen verändert waren. [37, 39, 27, 42, 41, 51]

Eine Bindung eines größeren Anteils der kleinen Ionen konnte bisher in Protein - Salz - Lösungen einer Zusammensetzung, die in etwa der des Zytoplasmas entsprach, nicht gefunden werden.

Da in Zytoplasma - Modelllösungen die Komponenten Wassermoleküle, Protein - Polyionen und Salzionen sind, kommen als Wechselwirkung hauptsächlich in Frage elektrostatische Wechselwirkungen aller Komponenten untereinander, die Bindung von Wasser

an der Oberfläche der Proteinmoleküle und eine spezifische Ionenbindung an den Protein - Polyionen.

Die Wechselwirkung von KCl und NaCl in hochkonzentrierten Proteinlösungen (Rinder - Serum - Albumin, Hämoglobin und Zytoplasmafraktionen) wurde schon in früheren Arbeiten untersucht. Speziell beim Hämoglobin ergab sich in isoionischen Lösungen, daß es sich im wesentlichen um eine spezifische Anionenbindung am Hämoglobin handelte [27, 51].

Zweck dieser Arbeit ist es nun, die Wechselwirkung von Hämoglobin mit Salzionen weiter zu untersuchen. Dazu wurden diesmal vier Salze ausgesucht, KF, KBr, KJ und KNO_3 . Es handelte sich also um eine Reihe einwertiger Anionen mit unterschiedlichen Radien. Unter diesen Bedingungen könnte einmal mehr spezifische Anionenbindung von Ionen am Hämoglobinmolekül gezeigt werden. Es wäre außerdem zu erwarten, daß Anionen mit unterschiedlichen Radien unterschiedlich am Hämoglobinmolekül gebunden werden. Weiterhin besteht durchaus die Möglichkeit, daß das Nitratanion auf Grund seines komplizierteren Aufbaus Besonderheiten bietet.

Als Maß für die Wechselwirkung der Salzionen untereinander und mit den Protein - Polyionen wurde der mittlere Aktivitätskoeffizient des Salzes verwendet. Er kann z.B. über die elektromotorische Kraft (EMK) einer galvanischen Zelle gemessen werden.

Als Meßmethode für die mittleren Aktivitätskoeffizienten diente die Messung der EMK mit Ionenaustauscher - Membranelektroden. [46, 9, 47]

Die Hämoglobinkonzentration wurde variiert und die Salzkonzentration konstant gehalten. Die Lösungen

waren isoionisch und hatten einen pH-Wert von ca. 7,2. Entsprechend der physiologischen Kaliumkonzentration im Erythrozyten, der der gedankliche Ausgangspunkt unseres Modells war, und um Vergleiche mit einer früheren Arbeit zu haben [27], betrug die Salzkonzentration 0,1 Mol pro kg Wasser.

2. Methodik

2.1 Theorie der Messung

2.1.1 Messung der EMK mit Membranelektroden

Unter der elektromotorischen Kraft, EMK, einer elektrochemischen Zelle versteht man die Potentialdifferenz, die im stromlosen Zustand zwischen den beiden Elektroden abgegriffen werden kann.

Sie kann gemessen werden durch Anlegen einer Gegenspannung gleicher Größe.

Es gilt folgende Beziehung [17]:

$$- \Delta G = F \cdot E \quad (1)$$

wobei ΔG die Änderung der freien Enthalpie der elektrochemischen Zelle,

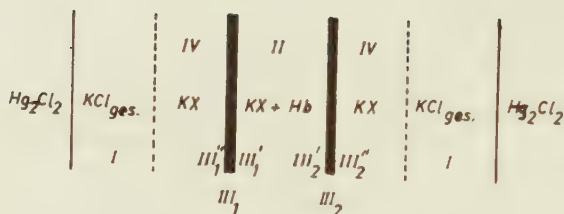
F die Faradaykonstante und

E die EMK zwischen den beiden Elektroden, gemessen im stromlosen Zustand, ist

Wird durch reversibles Verschieben von einem Mol Elektronen über die Potentialdifferenz E , im äußeren Stromkreis, die elektrische Arbeit FE geleistet, so nimmt die freie Enthalpie der Zelle um den Betrag ΔG ab.

Voraussetzung ist konstanter Druck und konstante Temperatur.

Es wird nun folgende Dreikammer - Meßzelle betrachtet:



I und V sind gesättigte KCl - Lösungen (Salzbrücken), in die je eine Thalamidelektrode eintaucht. II soll eine Lösung mit Hämoglobin und Salz darstellen. Die Phasen IV sind reine Salzlösungen (K-X). III_1 und III_2 sollen wässrige Membranphasen darstellen die nur für H_2O und K-X durchgängig sind. III_1' , III_1'' , III_2' und III_2'' sind die Teile der Membranphasen III_1 und III_2 , die direkt an II und IV angrenzen.

Da die Thalmidelektroden in identische Lösungen eintauchen, heben sich die Beiträge zu ΔG durch die chemischen Reaktionen an den beiden Elektroden gegenseitig auf, und es gilt für die betrachtete Zelle:

$$-FE = \int_{links}^{rechts} T_i d\mu_i \quad (2)$$

dabei ist T_i die Transportzahl der Neutralkomponente i (Zahl der Mole der Sorte i, die beim Durchgang von 1F Ladung in positiver Stromrichtung transportiert werden), und

μ_i das chemische Potential der Neutralkomponente i.

Das Integral liefert nur dort Beiträge, wo mindestens für eine Neutralkomponente $d_i \neq 0$ und gleichzeitig $T_i \neq 0$ ist. Es läßt sich daher aufspalten in:

$$\int_{\text{links}}^{\text{rechts}} \sum T_i d\mu_i = \int_I^{\text{IV}} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{IV}}^{\text{III}_1''} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{III}_1''}^{\text{III}_1'} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{III}_1'}^{\text{II}} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{II}}^{\text{III}_2'} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{III}_2'}^{\text{III}_2''} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{III}_2''}^{\text{IV}} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{IV}}^{\text{V-I}} \sum T_i d\mu_i \quad (3)$$

Da die Salzbrücken in identische Lösungen tauchen, heben sich die Integrale $\int_I^{\text{IV}}$ und $\int_{\text{IV}}^{\text{V-I}}$ gegenseitig auf.

Nimmt man an beiden Seiten der Membranen scharfe Phasengrenzen gegen die Lösungen an, so stellt sich zu beiden Seiten ein elektrochemisches Gleichgewicht ein, und die Änderung des chemischen Potentials der durchtrittsfähigen Neutralkomponenten an diesen Stellen ist gleich Null.

Dadurch verschwindet das 2., 4., 5. und 7. Integral und man erhält:

$$-FE = \int_{\text{III}_1''}^{\text{III}_1'} \sum T_i d\mu_i + \int_{\text{III}_2'}^{\text{III}_2''} \sum T_i d\mu_i \quad (4)$$

bzw.

$$-FE = \int_{\text{III}_2'}^{\text{III}_2''} [-T_{\text{KX}} d\mu_{\text{KX}} + T_{\text{H}_2\text{O}} d\mu_{\text{H}_2\text{O}}] - \int_{\text{III}_1'}^{\text{III}_1''} [-T_{\text{KX}} d\mu_{\text{KX}} + T_{\text{H}_2\text{O}} d\mu_{\text{H}_2\text{O}}] \quad (5)$$

Die Transportzahlen T_i der Neutralkomponenten lassen sich durch folgende Prozedur durch die elektro-

chemischen Überföhrungszahlen t_i ihrer Ionenbestandteile ausdröcken:

Die Übergangsschichten, über die sich die Integrale erstrecken, lassen sich als Mischungen der beiden aneinandergrenzenden Phasen auffassen, in denen die Zusammensetzung der linken Phase (III_1'') kontinuierlich in die der rechten Phase (III_1') übergeht. [18]

Links und rechts jeder Grenzschicht föhrt man je eine X^- -Elektrode als Anode bzw. Kathode ein und transportiert 1F Ladung durch eine außen angelegte Spannungsquelle von der Anode zur Kathode. Dabei verschwinden an der linken X^- -Elektrode ein Mol X^- Ionen. Gleichzeitig werden durch die Grenzschicht zwischen den fiktiven Elektroden t_{X^-} Mole X^- Ionen von der rechten in die linke Lösung transportiert und t_{K^+} Mole K^+ Ionen von der linken Lösung in die rechte.

t_{K^+} und t_{X^-} sind dabei die Überföhrungszahlen der K^+ und X^- Ionen.

Insgesamt ändert sich die Zusammensetzung der linken Lösung beim Durchgang von 1F von links nach rechts somit um $-(1 - t_{X^-})$ Mole KX , da gilt:

$$\sum_i t_i = 1 \quad (6)$$

In der rechten Lösung betragen die entsprechenden Änderungen $(1 - t_{X^-})$ Mole KX .

Analoge Betrachtungen gelten für die Phasenübergänge III_2' nach III_2'' .

Verallgemeinernd erhält man aus Gleichung (5),

$$\begin{aligned}
 -FE &= \int_{\bar{Q}_1'}^{\bar{Q}_2''} [(1 - t_{X-}) d\mu_{KX} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}] - \\
 &- \int_{\bar{Q}_1'}^{\bar{Q}_2''} [(1 - t_{X-}) d\mu_{KX} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}] \quad (7)
 \end{aligned}$$

oder

$$-FE = \int_{\bar{Q}_2'}^{\bar{Q}_2''} [t_{K+} d\mu_{KX} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}] - \int_{\bar{Q}_1'}^{\bar{Q}_1''} [t_{K+} d\mu_{KX} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}] \quad (8)$$

Man erkennt, daß E für zwei völlig gleiche Membranen oder auch für freie Übergangsschichten zwischen den Phasen II und IV verschwindet. Nur wenn III_1 und III_2 unterschiedliche Eigenschaften haben, kann E Werte $\neq 0$ annehmen.

An den Membrangrenzflächen stellt sich bezüglich der Neutralkomponenten ein thermodynamisches Gleichgewicht ein, so daß gilt:

$$\begin{aligned}
 \mu_{KX}^{III_1'} &= \mu_{KX}^{II} = \mu_{KX}^{III_2'} \\
 \mu_{KX}^{III_1''} &= \mu_{KX}^{IV} = \mu_{KX}^{III_2''} \\
 \mu_{H_2O}^{III_1'} &= \mu_{H_2O}^{II} = \mu_{H_2O}^{III_2'} \\
 \mu_{H_2O}^{III_1''} &= \mu_{H_2O}^{IV} = \mu_{H_2O}^{III_2''} \quad (9)
 \end{aligned}$$

Definitionsgemäß gilt [26]:

$$\mu_{KX} = \mu_{o,KX} + R\mathcal{T} \ln a_{KX}$$

$$\mu_{\text{H}_2\text{O}} = \mu_{\text{o},\text{H}_2\text{O}} + R\mathcal{T} \ln a_{\text{H}_2\text{O}} \quad (10)$$

wobei μ_{KX} das chemische Potential von KX,
 $\mu_{\text{o},\text{KX}}$ das chemische Standardpotential von KX,
 a_{KX} die Aktivität von KX,
 R universelle Gaskonstante,
 $\mathcal{T}$ absolute Temperatur
 $\mu_{\text{H}_2\text{O}}$ chemisches Potential von H_2O ,
 $\mu_{\text{o},\text{H}_2\text{O}}$ chemisches Standardpotential von H_2O
 und
 $a_{\text{H}_2\text{O}}$ Aktivität von H_2O ist:

Ferner ist: [43]

$$a_{\text{KX}} = (a_{\pm})^2, \quad (11)$$

mit $a_{\pm}$ als mittlerer (Ionen-) Aktivität von KX.

Außerdem gilt noch:

$$\mu_{\text{o},\text{KX}}^{\text{IV}} = \mu_{\text{o},\text{KX}}^{\text{II}} \quad (12)$$

Durch Einsetzen von Gl. (9), (10), (11) und (12) in Gleichung (8) erhält man:

$$\begin{aligned} -FE &= (\bar{\epsilon}_{\text{K}^+}^{(1)} - \bar{\epsilon}_{\text{K}^+}^{(2)}) (\mu_{\text{KX}}^{\text{II}} - \mu_{\text{KX}}^{\text{I}}) + (T_{\text{H}_2\text{O}}^{(2)} - T_{\text{H}_2\text{O}}^{(1)}) \\ &\quad (\mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{II}} - \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{I}}) = \\ &= 2R\mathcal{T} (\bar{\epsilon}_{\text{K}^+}^{(2)} - \bar{\epsilon}_{\text{K}^+}^{(1)}) \ln \frac{a_{\pm}^{\text{II}}}{a_{\pm}^{\text{I}}} + \frac{1}{2} (T_{\text{H}_2\text{O}}^{(2)} - T_{\text{H}_2\text{O}}^{(1)}) \ln \frac{a_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{II}}}{a_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{I}}} \end{aligned} \quad (13)$$

Wählt man nun für Membran (2) eine Kationenaustauschermembran (K), für Membran (1) eine Anionenaust-

tauschermembran (A), so erhält man mit $\bar{t}_{K^+}^{(2)} = \bar{t}_{K^+}^K =$
 $= 1 - \bar{t}_{X^-}^K$:

$$-FE = 2R\mathcal{T} \left[\left(1 - \bar{t}_{X^-}^K - \bar{t}_{X^-}^A \right) \ln \frac{a_{\pm}^{\bar{IV}}}{a_{\pm}^{\bar{II}}} + \frac{1}{2} \left(\bar{T}_{H_2O}^K - \bar{T}_{H_2O}^A \right) \ln \frac{a_{H_2O}^{\bar{IV}}}{a_{H_2O}^{\bar{II}}} \right]$$

(14)

wobei $\bar{t}_{K^+}^K, \bar{t}_{X^-}^K$ mittlere Überföhrungszahl der K^+ -
 Ionen bzw. Anionen in der Kationen-
 austauschermembran,
 $\bar{t}_{K^+}^A, \bar{t}_{X^-}^A$ mittlere Überföhrungszahl der K^+ -
 Ionen bzw. Anionen in der Anionen-
 austauschermembran,
 $\bar{T}_{H_2O}^K, \bar{T}_{H_2O}^A$ Mittelwert der Transportzahlen von
 Wasser in der Kationen- bzw. Anionen-
 austauschermembran,
 $a_{\pm}$ mittlere Aktivität von KX ,
 a_{H_2O} Aktivität des Wassers,
 R universelle Gaskonstante und
 $\mathcal{T}$ absolute Temperatur ist.

Damit ist eine Beziehung gegeben zwischen der meß-
 baren EMK und der mittleren Aktivität der Salzlö-
 sungen in Phase II und IV.

Nimmt man an, daß man ideale Membranen hat, so wird
 die Coionenüberföhrung ($\bar{t}_{X^-}^K = \bar{t}_{K^+}^A = 0$) vernachlässig-
 bar gering. Außerdem sind die Wassertransport-
 zahlen in der Anionen und Kationenaustauschermem-
 bran fast gleich ($\bar{T}_{H_2O}^K - \bar{T}_{H_2O}^A \approx 0$), [37] sodaß gilt:

$$E = - \frac{2R\mathcal{T}}{F} \ln \frac{a_{\pm}^{\bar{IV}}}{a_{\pm}^{\bar{II}}} \quad (15)$$

In diesem Fall ist E somit gleich der elektromoto-
 rischen Kraft für je zwei selektive Kalium-

und X^- - Elektroden zwischen den Phasen IV und II, d.h. jede Membrangrenzfläche verhält sich wie eine reversible Kalium- bzw. X^- - Elektrode. Auf dieses Verhalten ist die Bezeichnung "Membranelektrode" [45] zurückzuführen.

2.1.2 Bestimmung der mittleren Aktivität

Die Messung der EMK der Dreikammer - Meßzelle mit einer Kationen- und einer Anionenaustauschermembran kann zur Bestimmung der mittleren Aktivität von Salzen verwendet werden (Gl. 15)

Mit der Nulltitrationsmethode von SOLLNER [24] kann man die mittlere Aktivität von KX in Phase II bestimmen.

Auf Grund der Beziehung:

$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} \cdot m_{KX} \quad (16)$$

wobei $a_{\pm}$ die mittlere Aktivität von KX,
 $\gamma_{\pm}$ der mittlere Aktivitätskoeffizient und
 m_{KX} die mittlere Ionenkonzentration von KX in Molen pro kg Wasser ist,

kann die Aktivität in den beiden Phasen IV durch Änderung der KX-Konzentration verändert werden.

Für den Spannungswert $E=0$ gilt nach Gleichung (15)

$$a_{\pm}^{II} = (a_{\pm}^{IV})_{E=0} \quad (17)$$

wobei $a_{\pm}^{II}$ die mittlere Aktivität von KX in Phase II und

$(a_{\pm}^{IV})_{E=0}$ die mittlere Aktivität von KX in Phase IV, für die $E=0$ wird, bedeutet.

IV
($a_{\pm}$)_{E=0} ist die Meßgröße. Sie kann graphisch (siehe Abb. 5, 6, 7 u. 8 Seite 29 - 31) oder rechnerisch, durch lineare Regression, bestimmt werden.

2.2 Herstellung der Hämoglobin - Salz - Lösungen

2.2.1 Hämoglobin - Stammlösung

Das benötigte Hämoglobin stammte aus Rinderblut. Die Aufbereitungsmethode war ähnlich einer Methode von DRABKIN [14] und HINSON [20]. Ca. 30 Minuten nach Blutentnahme wurde mit dem Abzentrifugieren begonnen (CHRIST, Kühlzentrifuge: JUNIOR II KS; 30 min. bei 2600 rpm, entsprechend 1950 g und 4° C) Der Überstand von Plasma und Leukozyten wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es schlossen sich vier Erythrozytenwaschvorgänge an, einmal mit 0,9%-iger NaCl-Lösung und dreimal mit 1,2%-iger NaCl-Lösung. (CHRIST, Kühlzentrifuge; TYP JUNIOR II KS; 20 min. bei 5600 rpm, entsprechend 5470 g und 4° C)

Die Waschlösungen (NaCl p.A.; MERCK) wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

Um eine hohe Ausgangskonzentration der Hämoglobin-Stammlösung zu erhalten, wurden die Erythrozyten nach der letzten Wäsche in einer Ultrazentrifuge dicht gepackt. (BECKMANN, SPINCO 12, Rotor 19; 90 min. bei 19000 rpm, entsprechend 17000 - 53000 g bei 4° C)

Zur Hämolyse wurden die Erythrozyten mit entmineralisiertem Wasser und Toluol [20] im Verhältnis 1 : 1,2 : 0,4 gemischt und ca. acht Stunden bei 4° C gerührt. Durch anschließendes Zentrifugieren (2600 rpm, 90 min. und 4° C) konnte der größte Teil

der Zellmembranen und des Toluols leicht entfernt werden. Durch einen anschließenden Ultrazentrifugengang (19000 rpm, 90 min. und 4° C) wurden letzte Membranreste entfernt. Man erhielt eine Hämoglobininlösung mit einer Konzentration von 10 - 20 Gewichtsprozenten.

2.2.2 Entsalzen der Hämoglobin - Stammlösung

Durch zweimaliges Passieren eines Mischbettaustauschers (BIO - RAD, AG 501 - X 8 (D); 4° C) wurden aus der Hämoglobinstammlösung die Salzionen entfernt. Danach betrug die Leitfähigkeit ca. 10^{-5} S/cm bei einer Temperatur von 4° C. Sie wurde über eine Widerstandsmessung mit einer Tauchzelle (Universal - Impedanzbrücke Typ 1650 - A, GENERAL RADIO COMP. West Concord, Massachusetts, USA) und nach folgender Formel bestimmt:

$$\kappa = \frac{1}{R \cdot C} \quad (18)$$

wobei κ die spezifische Leitfähigkeit,
R den Widerstand und
C eine Meßzellkonstante bedeuten.

Durch Gelfiltration wurde schon früher nachgewiesen, daß der Ionenaustauscher keinen Einfluß auf die Hämoglobinemoleküle im Sinne einer Denaturierung ausübt. [27, 51]

2.2.3 Aufkonzentrieren der Hämoglobin - Stammlösung

Mit den Geräten der Firma SARTORIUS MEMBRANFILTER GmbH (Pumpe SM 168 96: 500 ml/min., 2kp/cm²;

Ultrafiltrationsgerät SM 165 25) wurden mit fünf bis sieben Membranen (Filter SM 121 36 : Cellulosenitrat, Durchlässigkeit bis Molekulargewicht 10 000, Porendurchmesser 5 mm, Wasserdurchlässigkeit $0,5 - 0,3 \cdot 10^{-2}$ ml/min. und cm^2 bei 700 mm Hg) durch Ultrafiltration Hämoglobinkonzentrationen bis zu 44 Gew.% erzielt. (Schematische Darstellung in Abb.1, Seite 15)

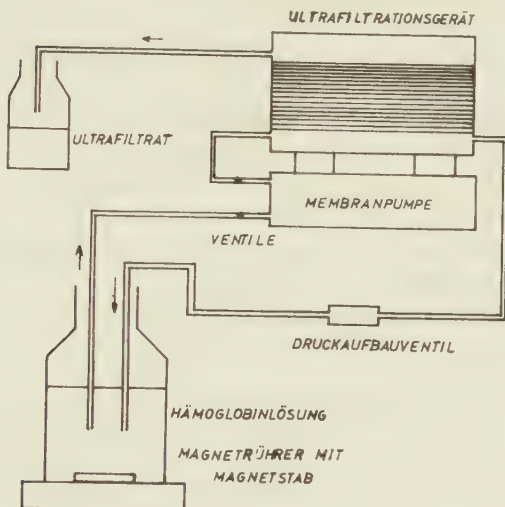


Abb. 1: Aufkonzentrieren der Hämoglobin - Stammlösung (schematische Darstellung)

Durch Verwenden einer größeren Anzahl von Diafiltrationsmembranen wurde die Filtrationszeit stark herabgesetzt, allerdings auch der Verlust an Hämoglobin

globulinlösung, wegen des größeren Totraums, vergrößert. Während des Filtrationsvorgangs wurde die Hämoglobin - Stammlösung durch einen Magnetrührer langsam gerührt. Die ganze Apparatur befand sich in einer Kühlkammer wo im Mittel eine Temperatur von 4° C herrscht.

2.3 Analyse der Hämoglobin - Salz - Lösung

2.3.1 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration wurde mit Hilfe der Trockengewichtsbestimmung ermittelt.

Zu diesem Zweck wurden 2 - 3 ml Hämoglobinlösung bei 110° C getrocknet bis Gewichtskonstanz auftrat. Außerdem konnte die Konzentration durch eine Dichtemessung bestimmt werden.⁺)

Mit dieser Methode konnte die Konzentration wesentlich schneller ermittelt werden. [6]

Die Molalität an Hämoglobin ergab sich nach der Gleichung:

$$m_{\text{Hb}} = \frac{\xi \cdot 1000}{(1 - \xi) \cdot G_{\text{Hb}}} \quad (19)$$

wobei m_{Hb} die Anzahl der Mole Hämoglobin pro kg Wasser,

ξ der Hämoglobintrockengewichtsanteil und

G_{Hb} das Molekulargewicht des Hämoglobin (MG = 64500 [3]) ist.

+) An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernhard für die Durchführung der Dichtemessung bedanken.

Der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung der Hämoglobininlösung betrug weniger als $\pm 0,5\%$.

2.3.2 Messung des pH - Wertes

Zur Bestimmung des pH - Wertes der Hämoglobin - Salz - Lösung diente das RADIOMETER - pH - Meter (Typ: 25 SE der Firma RADIOMETER, Kopenhagen) mit einer Einstabglaselektrodenkette.

Unabhängig von der Hämoglobinkonzentration wurden bei Zimmertemperatur (23°C) folgende pH - Werte gemessen:

KF	pH	7,17
KBr	pH	7,16
KNO ₃	pH	7,23
KJ	pH	7,24

2.3.3 Gelfiltration

Da in früheren Arbeiten [27, 51] die Hämoglobin-stammlösung bereits chromatographisch untersucht wurde und dabei keine durch die Aufbereitung entstandenen Molekülschäden festgestellt wurden, war diesmal vor allem notwendig zu wissen, ob durch die Salze KF, KBr, KJ und KNO₃ ein verändernder Einfluß auf die Hämoglobinmoleküle ausgeübt wurde.

Hierzu diente eine ca. zwei Meter lange mit SEPHADEX Gel G 150 gefüllte Säule, die bei einer Temperatur von 2°C betrieben wurde. Sie wurde jeweils mit sterilisierter und entgaster 0,1 molaler Salzlösung äquilibriert. Aufgetragen wurden dann 3ml

einer 1 - 3%igen Hämoglobinlösung mit einer Salzkonzentration von 0,1 Mol pro kg Wasser. Ein Fraktionssammler sammelte die Elutionsflüssigkeit zu je drei Milliliter auf. Auswertung erfolgte durch das ZEISS Spektralphotometer PMQ II bei 280 nm.

Das Chromatogramm ergab für die Salze KF, KBr, KJ und KNO_3 einen einzigen steilen und symmetrischen Peak, der immer an gleicher Stelle erschien, wie beim Chromatogramm der Hämoglobinstammlösung.

Daraus kann geschlossen werden, daß die obigen Salze keinerlei Denaturierung, Dimerisierung, Aggregation oder Molekülbrüche am Hämoglobinmolekül verursachen und außerdem die Durchlaufgeschwindigkeit nicht verändern.^{+) (s. Abb.2, Seite 19)}

2.3.4 Salzeinwaage

Um mehrere Hämoglobinkonzentrationen mit einer Konzentration des jeweiligen Salzes von 0,1 Mol pro kg Wasser mit möglichst geringen Meßfehlern herzustellen, wurde zuerst in eine größere Menge der Hämoglobin - Stammlösung (ca. 180 g) der Maximalkonzentration die erforderliche Salzmenge eingewogen. Die weiteren niedrigeren Hämoglobinkonzentrationen wurden durch Verdünnung mit 0,1 molaler Salzlösung gewonnen. Für eine Messung wurden immer fünf Hämoglobinkonzentrationen hergestellt. Der Fehler in der Salzkonzentration bei dieser Methode betrug $\pm 0,1\%$.

+) Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Gelfiltration danke ich Frau Dr. H. Schüssler, sowie Herrn M. Peuten und Herrn W. Hierl.

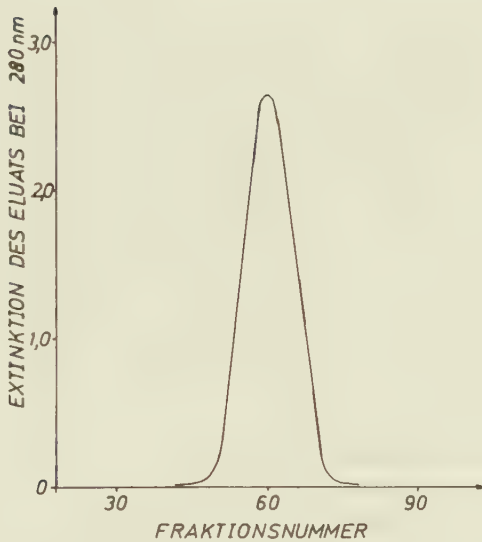


Abb. 2: Gelchromatogramm einer Hämoglobin - KX -
Lösung am Beispiel des Salzes KNO_3 .
Extinktion des Eluats bei 280 nm in Ab-
hängigkeit vom Elutionsvolumen (Fraktions-
nummer).
Hämoglobinkonzentration: 2%
Konz. des KNO_3 : 0,1 Mol/kg H_2O
Äquilibrierung der Säule und Elution mit
0,1 molaler KNO_3 -Lösung.

2.4 Messung der mittleren Aktivität

2.4.1 Meßaufbau

Die mittlere Aktivität der Salz KF, KBr, KJ und KNO_3 wurde nach dem Verfahren von PFISTER [37] mit Ionenaustauscher - Membranelektroden gemessen. Es handelt sich um eine Dreikammermeßzelle. (s. Abb. 3 und 4) Die Dreiteilung wurde durch eine Anionen- und eine Kationenaustauschermembran bewirkt. In die mittlere Kammer wurde die Hämoglobin - Salz - Lösung eingefüllt. In den äußeren Kammern befand sich reine Salzlösung gleicher Konzentration. In sie tauchten die mit Thalamidelektroden in Verbindung stehenden Salzbrücken ein. Diese endeten in spitz ausgezogenen, hakenförmig nach oben umgebogenen Glaskapillaren. ($\varnothing$ 100 μm) Der ganze Aufbau befand sich in einem Faraday'schen Käfig zur Abschirmung von elektrischen und elektromagnetischen Störfeldern. Die Spannung an den Thalamidelektroden wurde durch einen Schwingkondensatormeißverstärker abgegriffen. Er war verbunden mit einem Kompensationsschreiber. Für die Meßzelle war ein regelbares Rührwerk installiert.

2.4.2 Meßzelle

Die Dreikompartiment - Meßzelle [37] bestand aus Plexiglas. (Längsschnitt s. Abb. 4) Das Volumen jedes Kompartiments betrug 3 - 5 ml. Die beiden äußeren Zellen sind durch 2 mm Bohrungen mit den Elektrodenräumen verbunden, in die die Salzbrük-

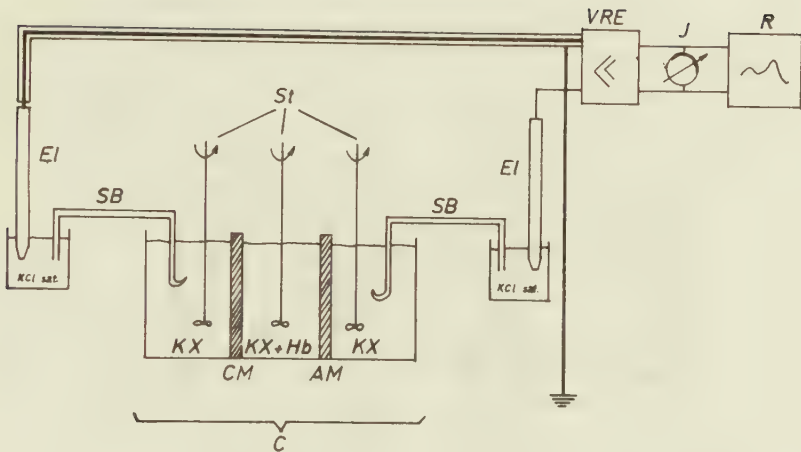


Abb.3: Schematischer Aufbau der Meßanordnung zur Bestimmung der mittleren Aktivität von KX in konzentrierten Hämoglobininlösungen mit Ionenaustauscher - Membranelektroden.

- C : Dreikompartiment - Meßzelle;
- CM : Kationenaustauschermembran;
- AM : Anionenaustauschermembran;
- ST : Rührvorrichtung;
- SB : Salzbrücken;
- V : Vorratsgefäß;
- EI : Thalämielektroden;
- VRE : Meßverstärker;
- J : Anzeigeinstrument;
- R : Potentiometerschreiber.

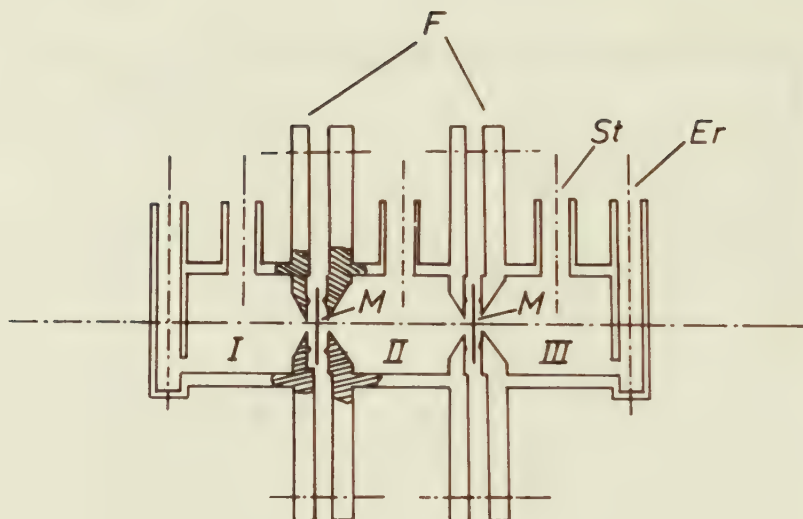


Abb.4: Längsschnitt durch eine Dreikompartmentmeß-
zelle (schematisch): nach Menges [27]

Querschnitt: zylindrisch

F : Flansche;

St : Einfüllstutzen;

Er : Elektrodenröhre;

M : Ionenaustauschermembranen;

I : Meßkammer (Titrationslösung);

II : Meßkammer (KX + Hämoglobinslösung);

III : Meßkammer (Titrationslösung).

Material: Plexiglas

ke eintauchen. Zwischen die Kammern sind die Ionenaustauschermembranen, (Kontaktfläche je $0,12 \text{ cm}^2$) die zur Abdichtung an O-Ringe aus Silikonummi gepreßt wurden, eingefügt.

Jede Kammer konnte durch einen Einfüllstutzen von oben her gefüllt werden. Hier wurden auch die Rührstäbe eingeführt.

Die drei Kammern wurden durch mit Schrauben verbundenen Flanschen zusammengehalten.

2.4.3 Ionenaustauschermembranen

Verwendet wurden die Ionenaustauschermembranen der Firma IONICS inc., Watertown, Mass., USA. Sie sind aus Polystyrol, vernetzt mit Divinylbenzol und besitzen ein zusätzliches Stützgewebe aus "Dynel". Die Dicke beträgt ca. 0,7 mm. Die Kationenaustauschermembran (Typ: Nepton CR-61) besitzt Festionen, die Anionenaustauschermembran (Typ: Nepton AR-111) tertiäre und quarternäre Ammoniumbasen.

Vor Gebrauch wurden die Membranen in der jeweiligen Salzlösung mit Anionen und Kationen beladen. Aufbewahrt wurden sie in 0,1 molaler Salzlösung bei 4°C um Austrocknung zu vermeiden.

Die Konzentration wurde außerdem so gewählt, wie sie der Größenordnung der Konzentrationen der Titrationslösungen entspricht.

Die Festionenkonzentration der Anionenaustauschermembran betrug ca. 2 Äquival./kg H_2O , die der Kationenaustauschermembran ca. 4 Äquival./kg H_2O .

[16, 38, 37]

Die Wassertransportzahl bei Gleichgewicht der Membranen mit 0,1 molaler KCl Lösung war 8 Mol/Fara-

day. [49, 16, 50]

Die Coionenüberföhrungszahl im untersuchten Konzentrationsbereich betrögt für KCl nach PFISTER [37] 0,03 - 0,08.

2.4.4 Elektroden und Salzbröcken

In die Meßlösungen tauchten Glaskapillaren ein, die mit 3%igem Agar-Agar-Gel (DIFCO, purified agar) in gesättigter KCl - Lösung gefüllt waren. Um Diffusion und Konvektion in die Titrationslösungen zu vermeiden, waren sie zu Spitzen ($\varnothing$ ca. 100 μ m) ausgezogen und hakenförmig nach oben umgebogen. Geringfügige Diffusion und Konvektion waren trotzdem unvermeidbar. Die Konzentrationsänderung ist aber nach PFISTER [38] vernachlässigbar klein. (<1%)

Die Glaskapillaren waren über Schläuche ($\varnothing$ 1mm), gefüllt mit gesättigter KCl - Lösung, mit Vorratsgefößen von gesättigter KCl - Lösung verbunden. In diese Geföße tauchten die Thalamidbezugselektroden der Firma SCHOTT und GEN., Mainz ein. (s. Abb. 3)

2.4.5 Titrationslösungen

Alle Lösungen wurden durch Wögunq hergestellt. Kaliumfluorid erwies sich als hygroskopisch und mußte deshalb vorher im Trockenschrank bei 110⁰ C getrocknet werden. Anschließend wurde das getrocknete Salz gewogen und daraus eine hochkonzentrierte Lösung hergestellt, die dann je nach Bedarf verdünnt wurde. Die Reproduzierbarkeit der Konzentrationseinstellung nach dieser Methode betrug

$\pm 0,1\%$.

Die Aktivitätskoeffizienten der Salze wurden der Literatur entnommen [10].

Die Aktivitätskoeffizienten von KF in Konzentrationen unter $0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$ waren aus der Literatur nicht zu entnehmen. Die Werte wurden einmal gewonnen durch Nulltitration (als Außenlösungen für die Dreikompartimentmeßzelle dienten jeweils Salzlösungen mit den Konzentrationen $> 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$ zum andern durch Extrapolation nach den bekannten Werten der anderen Salze, KBr, KJ und KNO_3 .

2.4.6 Meßvorgang

Die Titrationslösungen wurden in die beiden Außenkammern der Dreikammermeßzelle eingefüllt, die Hämoglobin - Salz - Lösung in die Mittelkammer. Beim Wechseln der Titrationslösungen, deren Konzentrationen $0,07$; $0,085$; $0,10$; $0,12$ und $0,15 \text{ Mol Salz/kg H}_2\text{O}$ betrugen, wurden die Außenkammern jeweils mit der folgenden Lösung gespült. Damit wurden Konzentrationsfehler vermieden.

Im Laufe einer Meßreihe wurden jeweils fünf Hämoglobinlösungen verschiedener Konzentration bei gleichbleibender $0,1 \text{ molaler Salzkonzentration}$ gemessen.

Die Agar - KCl - Salzbrücken befanden sich zum Abgreifen der Spannungsdifferenz der Zelle in den beiden seitlich angebrachten Kaminen.

Nach Einfüllen der Lösungen wurden die Rührer und die Meßapparatur eingeschaltet und der Abschirmkäfig geschlossen. Die EMK wurde bis zum Erreichen eines konstanten Wertes mit dem Schreiber registriert. Die Einstellzeit betrug durchschnitt-

lich 1-5 Minuten und nahm in der Reihenfolge der Salze KF, KBr, KNO_3 und KJ zu.

Die an den Elektroden und Salzbrücken auftretenden Asymmetriespannungen lagen bei 0,4 bis 0,8 mV. Sie wurden eliminiert, indem die EMK zweimal gemessen wurde, wobei die Agar - KCl - Brücken vertauscht wurden. Die EMK ergab sich dann aus dem Mittelwert der beiden Absolutbeträge.

Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte lag bei durchschnittlich $\pm 0,5$ mV.

Die Spannungswerte einer Nulltitration (fünf Werte) aufgetragen als logarithmische Funktion der Aktivitäten der Titrationslösungen ergaben eine Gerade. Ihr Schnittpunkt mit der Geraden $E=0$ ergibt die mittlere Aktivität der Salz - Proteinlösung im Mittelkompartiment, $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$.

Die Meßwerte $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ wurden graphisch und durch lineare Regression ermittelt.

Als Beispiel für die Aktivitätsbestimmung sind die "Nulltitrationen" für eine 30,03 %ige Hämoglobin - KF - Lösung, eine 30,07 %ige Hämoglobin - KBr - Lösung, eine 30,06 %ige Hämoglobin - KNO_3 - Lösung und eine 28,10 %ige Hämoglobin - KJ - Lösung in den Abb. 5,6,7 und 8 auf Seite 29-32 dargestellt.

Die mittleren statistischen Abweichungen der EMK-Werte von der Ausgleichsgeraden betrugen durchschnittlich $\pm (0,28 \pm 0,11)$ mV.

Daraus ergibt sich ein mittlerer Fehler in $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ von $\pm 0,5$ %.

Die Genauigkeit der Methode wurde zunächst mit reinen Salzlösungen bekannter Aktivität geprüft. Es ergaben sich Abweichungen von den Literaturwerten von $< \pm 1$ %.

Die EMK ist direkt temperaturabhängig (Gleichung (15)). Außerdem geht in sie die Temperaturabhängigkeit der Coionenüberführungszahlen und der mittleren Aktivität ein.

Allerdings bleibt durch die Nulltitration, als Methode zur Bestimmung von Aktivitätskoeffizienten, nur die Temperaturabhängigkeit der mittleren Aktivität der Titrationslösungen erhalten. Diese ist relativ gering. Die Messungen konnten deshalb bei Zimmertemperatur ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) ohne Thermostatisierung durchgeführt werden.

Der Einfluß des Rührens wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht [37, 27]. Schwankungen der Rührgeschwindigkeit gingen sichtbar in die Steigung der Titrationsgeraden ein. Der Meßwert für die Aktivität der Salz - Proteinlösung in der Mittelzelle, $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$, wurde dadurch nicht verändert. Außerdem ist die Steigung der Titrationsgeraden innerhalb der Fehlergrenzen, bei optimaler Rührung, nicht beeinflusst durch die Konzentration des Hämoglobins im Mittelkompartiment, wie die Darstellung einiger Steigungswerte in Tabelle 1, Seite 28 zeigt.

		dE/d log a _± (mV/Dekade)	
		ohne Hb	mit Hb
0,1m KF	107,7 ± 0,7		105,9 ± 1,3 (18,5%ige Hb-Lös.)
			107,6 ± 1,1 (30,0%ige Hb-Lös.)
0,1m KBr	106,6 ± 0,5		107,3 ± 1,6 (18,6%ige Hb-Lös.)
			109,1 ± 2,1 (30,1%ige Hb-Lös.)
0,1m KNO ₃	106,2 ± 0,4		107,5 ± 0,5 (18,5%ige Hb-Lös.)
			107,9 ± 1,1 (30,1%ige Hb-Lös.)
0,1m KJ	102,5 ± 0,8		105,3 ± 1,1 (17,9%ige Hb-Lös.)
			107,8 ± 0,9 (28,1%ige Hb-Lös.)

Tabelle 1: Vergleich der Steigungen von Titrationsgeraden mit reinen Salzlösungen und mit Hämoglobin - Salz - Lösungen gleicher Salzkonzentration im Mittelkompartiment.

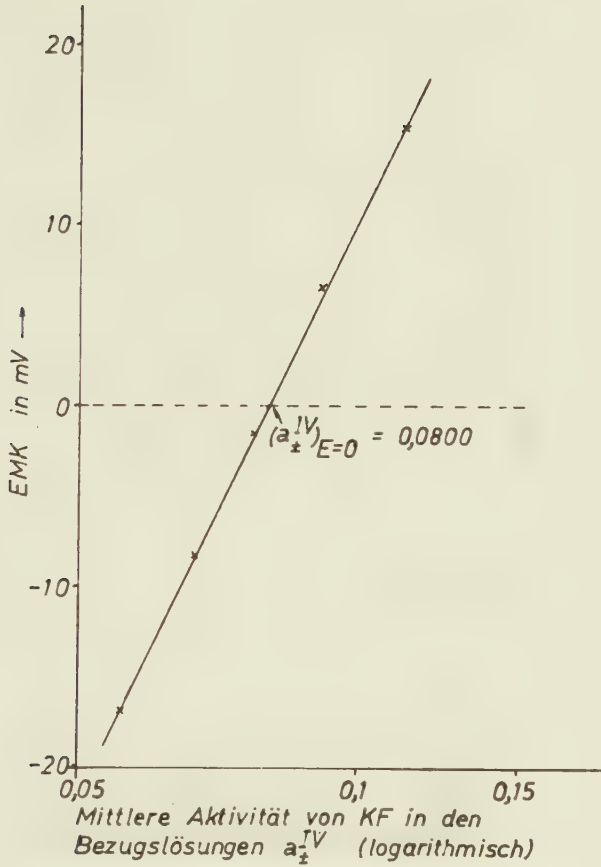


Abb. 5: Potentiometrische "Nulltitration" einer

30,0 %igen Hämoglobin - KF - Lösung:

Meßlösung: Hb-KF-Lösung bei pH 7,17

$$m_{\text{Hb}} = 6,655 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{F}^-} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{K}^+} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

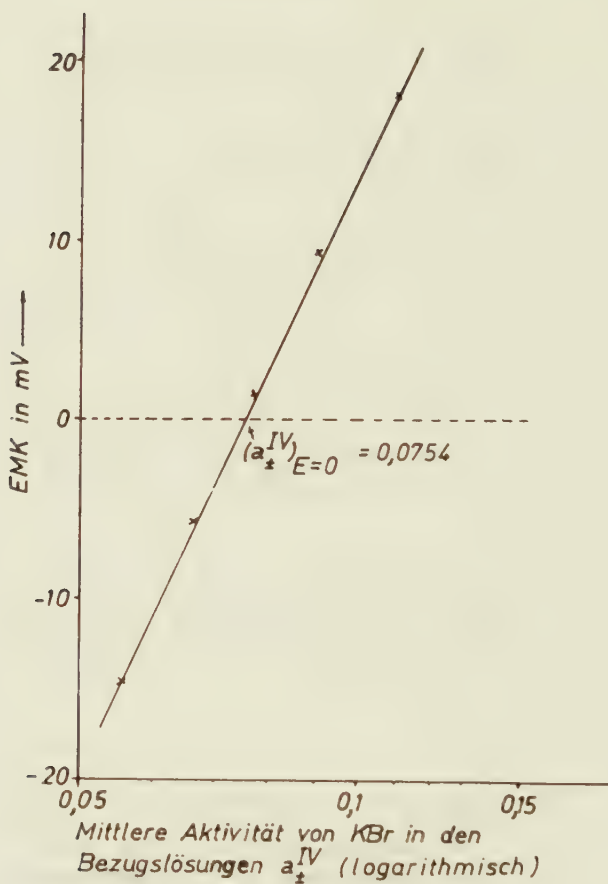


Abb. 6: Potentiometrische "Nulltitration einer
30,1 g/ligen Hämoglobin - KBr - Lösung:

Meßlösung: Hb-KBr-Lösung bei pH 7,16

$$m_{\text{Hb}} = 6,665 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{Br}^-} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{K}^+} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

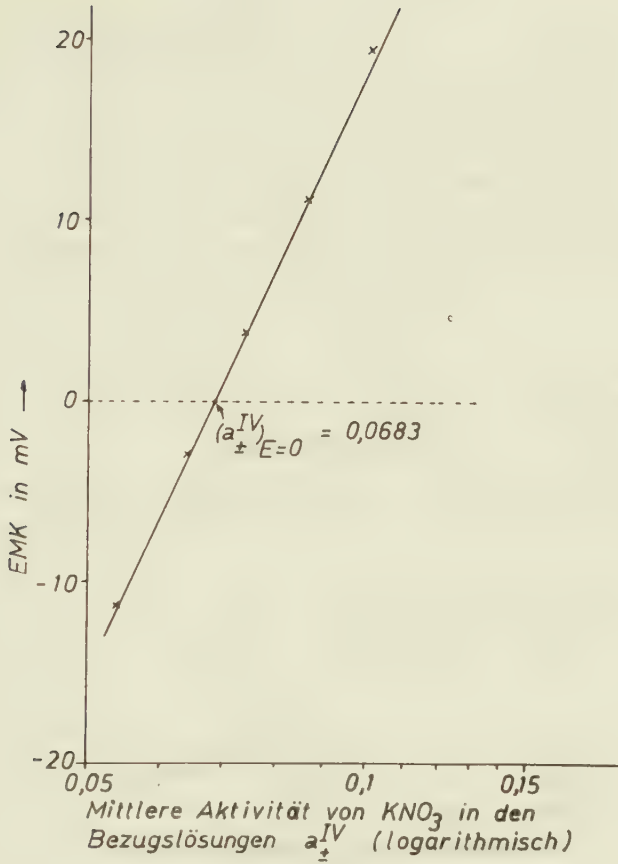


Abb. 7: Potentiometrische "Nulltitration" einer

30,1 %igen Hämoglobin - KNO_3 - Lösung:

Meßlösung: Hb- KNO_3 - Lösung bei pH 7,23

$$m_{\text{Hb}} = 6,662 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{NO}_3^-} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{K}^+} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

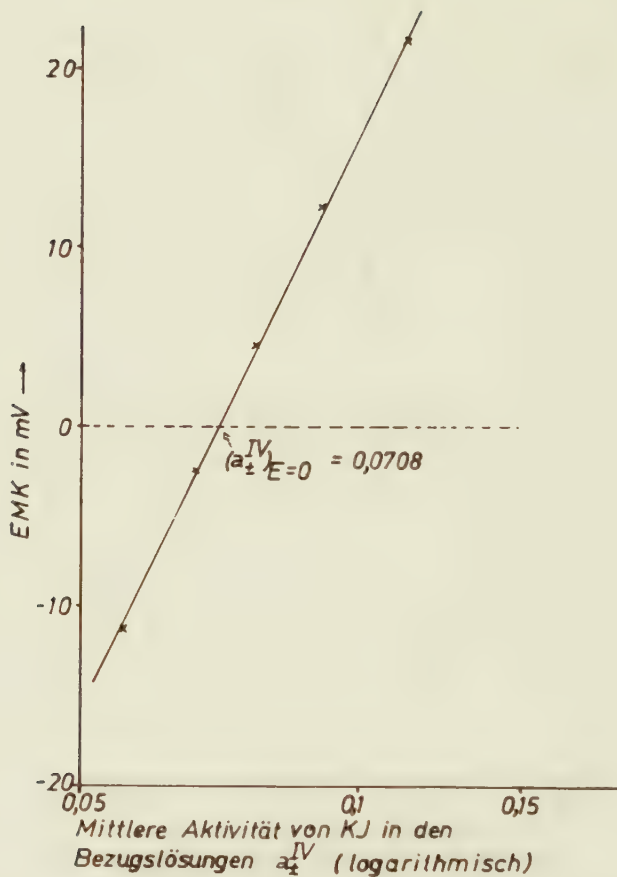


Abb.8: Potentiometrische "Nulltitration" einer

28,1 %igen Hämoglobin - KJ - Lösung:

Meßlösung: Hb-KJ-Lösung bei pH 7,24

$$m_{\text{Hb}} = 6,058 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{J}^-} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{K}^+} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$$

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient

Den Einfluß, den die Hämoglobinmoleküle auf die Anionen des Salzes ausüben, kann man durch die Änderung des mittleren Aktivitätskoeffizienten ausdrücken. Aus Gleichung (16) und unter Anwendung von Gl. (11) erhält man

$$\gamma_{\pm}^{\text{II}} = \frac{a_{\pm}^{\text{II}}}{\sqrt{m_{\text{K}^+}^{\text{II}} m_{\text{X}^-}^{\text{II}}}} \quad (20)$$

und unter Berücksichtigung der "Nulltitration" nach Gl. (17)

$$\gamma_{\pm}^{\text{IV}} = \frac{(a_{\pm}^{\text{IV}})_{\text{E}=0}}{\sqrt{m_{\text{K}^+}^{\text{IV}} m_{\text{X}^-}^{\text{IV}}}} \quad (21)$$

wobei $a_{\pm}^{\text{II}}$

$\gamma_{\pm}^{\text{II}}$

$m_{\text{K}^+}^{\text{II}}, m_{\text{X}^-}^{\text{II}}$

die mittlere Aktivität von KX in der Hämoglobin - KX - Lösung, der stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient von KX in der Hämoglobin - KX - Lösung und

die Einwaagekonzentration (je 0,1 Mol/kg H₂O) der Kalium- bzw. Salz- ionen in der Hämoglobin - KX - Lösung in Mol/kg Gesamtwasser ist

$\gamma_{\pm}^{\text{IV}}$ wird "Stöchiometrischer mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient" genannt. Er wird experimentell

bestimmt und enthält alle Einflüsse, auf das Salz, die Protein - Polyionen und Wassermoleküle, sowie Einflüsse, die die Salzionen untereinander ausüben.

In den zweiten Spalten der Tabellen 3 bis 6 (s.S. 59 - 62) sind die Ergebnisse für die stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von KF, KBr, KNO_3 und KJ angegeben.

Abb. 9, 10 und 11 zeigen die Ausgleichsgeraden durch die Meßpunkte in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration in $(\text{Mol/kg H}_2\text{O}) \cdot 1000$. (s.S. 35 - 37)

Man erkennt, daß $\gamma_{\pm}$ bei KF mit der Hämoglobinkonzentration ansteigt, bei den drei anderen Salzen jedoch abfällt. Aus den vier Kurven kann man entnehmen, daß das chemische Potential der Salze, dessen Maß bei konstanter Konzentration der mittlere Aktivitätskoeffizient ist, durch die Gegenwart der Hämoglobinmoleküle verändert wird. Diese Veränderung ist jedoch nicht sehr groß: bei größter Hämoglobinkonzentration betrug sie 4% Zunahme für KF und 14% Abnahme für KJ (extrapoliert).

Um weitere Aussagen treffen zu können, müssen mit Hilfe von Modellbetrachtungen verschiedene Wechselwirkungen betrachtet werden.

Es kommen drei verschiedene Mechanismen des Einflusses der Hämoglobinmoleküle, Salzionen und Wassermoleküle in Betracht, die streng genommen nicht als unabhängig von einander zu betrachten sind: die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit dem Wasser, die Auswirkung ihres elektrostatischen Feldes auf die kleinen Ionen und außerdem spezifische Bindungen von Ionen an das Hämoglobinmolekül.

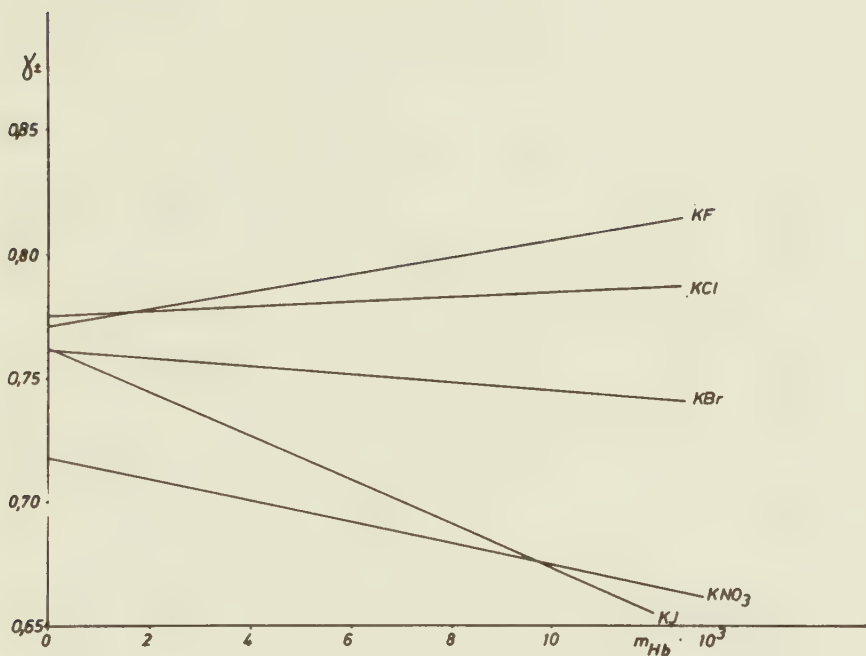


Abb. 9: Stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizienten von KF, KBr, KNO₃ und KJ in Hämoglobin - KX - Lösungen in Abhängigkeit von der Hämoglobin (Hb) - Konzentration in (Mol/kg H₂O) · 1000. (Ausgleichsgeraden)
Gerade von MENGES [27] für KCl miteingezeichnet.

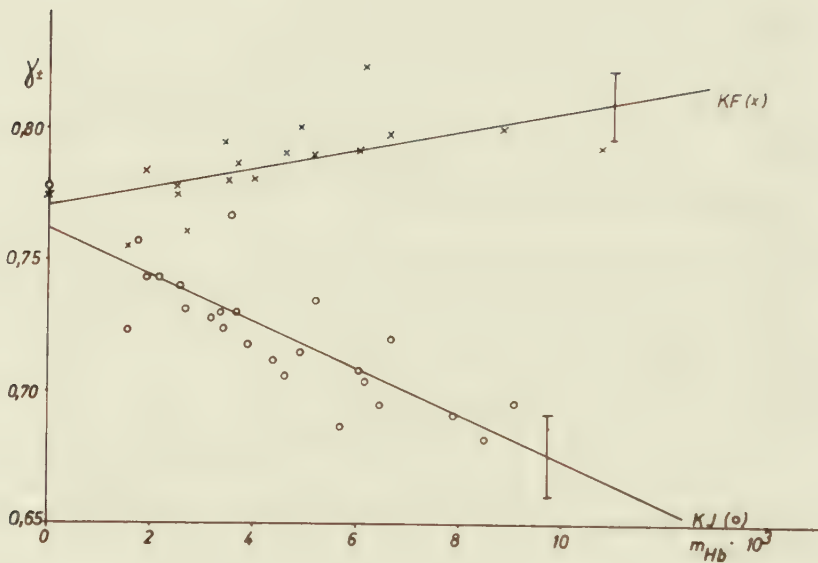


Abb. 10: wie Abb. 9, doch nur zwei Geraden (KF und KJ) mit Meßpunkten in einem Diagramm

[: Fehlerbreite, die die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden angibt.

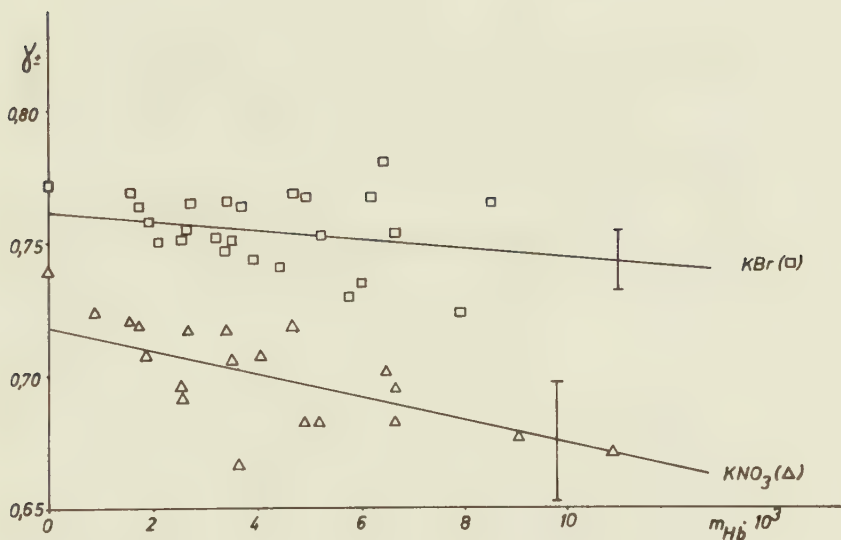


Abb. 11: wie Abb. 9, doch nur zwei Geraden (KBr und KNO_3) mit Meßpunkten in einem Diagramm

[]: Fehlerbreite, die die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden angibt.

Auf Grund dieser Modellbetrachtung läßt sich der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient aufspalten in drei Faktoren: [37]

$$f^{\pm} = (f^{\pm})_w \cdot (f^{\pm})_{el} \cdot (f^{\pm})_v \quad (22)$$

Die Indices w, el und v bedeuten die Wasserbindung der Makromoleküle, den Einfluß ihres elektrostatischen Feldes auf die kleinen Ionen und die chemische Bindung der kleinen Ionen an die Proteinmoleküle.

Wenn man $(f^{\pm})_w$ kennt, so hat man in dem Produkt $(f^{\pm})_{el} \cdot (f^{\pm})_v$, abgesehen von der Wechselwirkung der Ionen untereinander, den direkten Einfluß, den die Hämoglobinmoleküle auf die Salzionen ausüben.

3.2 Die Protein - Wasser - Wechselwirkung

Die Proteinmoleküle besitzen auf ihrer Oberfläche eine große Anzahl positiver und negativer Ladungen. Diese Oberflächenladungen, die dem Molekül den Charakter eines Multipols verleihen, und der Dipolcharakter der Wassermoleküle, sind die Ursache, daß Wassermoleküle mit den Proteinmolekülen in Wechselwirkung treten. Von diesem "gebundenen Wasser" wird angenommen, daß es auf Grund seiner geänderten Struktur keine Ionen gelöst enthält. ("non - solvent - water") [1, 12, 15, 13] Pro Gramm trockenen Proteins werden 0,1 - 0,5 g Wasser gebunden. [1, 2, 4, 7, 11, 19, 44, 29]. Wir nehmen einen Wert von 0,3 g an. Im verbleibenden freien Wasser ist die Salzionenkonzentration demnach höher als 0,1 Mol, da die Minwaage pro kg "Gesamtwasser" vorgenommen wurde.

Die tatsächliche Ionenkonzentration im "freien Wasser" kann man über folgende Beziehung berechnen:

$$(m_i)_w = \frac{m_i}{(1 - \eta^{m_{Hb}})} \quad (23)$$

m_i ist die Ionenkonzentration in Mol/kg Gesamtwasser

$(m_i)_w$ ist die Ionenkonzentration in Mol/kg "freies Wasser"

η ist die mittlere Menge "gebundenen Wassers" in kg/Mol Hämoglobin

m_{Hb} ist die Hämoglobinkonzentration in Mol/kg H_2O

Durch Einsetzen in Gl. (21) ergibt sich

$$f_{\pm} = \frac{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}}{(m_{K^+})_w (m_{X^-})_w} \cdot \frac{1}{(1 - \eta^{m_{Hb}})} \quad (24)$$

Die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit H_2O , $(f_{\pm})_w$, ist nach Vergleich mit Gl. (22) in dem Ausdruck:

$$(f_{\pm})_w = \frac{1}{(1 - \eta^{m_{Hb}})} \quad (25)$$

beschrieben. (Spalte 3 von Tab. 3 bis 6, s.S. 59 - 62) Dividiert man Gl. (22) durch Gl.(25), so erhält man

$$\frac{f_{\pm}^*}{(f_{\pm})_w} = (f_{\pm})_{el} \cdot (f_{\pm})_v = f_{\pm}^* \quad (26)$$

In den Abb. 12, 13 und 14 (s.S. 41 - 43) ist $f_{\pm}^*$, der für den Einfluß des gebundenen Wassers korrigierte mittlere Aktivitätskoeffizient, über der Hämoglobinkonzentration aufgetragen. Durch die Meßwerte ist eine Ausgleichsgerade gelegt. Die Zahlenwerte sind den Spalten 4 der Tabellen 3 bis 6, Seite 59 - 62, zu entnehmen.

Man kann sehen, daß jetzt mit zunehmender Hämoglobinkonzentration die Kurven für alle vier Salze abfallen. Dieser Abfall ist für die vier Salze unterschiedlich.

Um die Kurven besser vergleichen zu können wurden die Werte bei den verschiedenen Salzen auf den entsprechenden Aktivitätskoeffizienten der reinen Salzlösung gleicher Molalität bezogen. Damit erhält man die Kurven in Abb. 15, Seite 44: $f_{\pm}^* / f_{\pm}^0$ in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Dadurch kann man die Aussage treffen, daß die Kurve für das Salz KF am schwächsten und die für KJ am stärksten abfällt. Die Reihenfolge ist KF, KCl [27], KBr, KNO₃ und KJ.

Im übrigen zeigt sich in Abb. 15, daß die Ausgleichsgeraden die Ordinate bei allen Salzen etwa innerhalb der Fehlergrenze bei dem Sollwert 1,000 schneiden.

Die Änderung von $f_{\pm}^*$ in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration drückt die direkte Wirkung der Hämoglobinmoleküle auf die Salzionen und Wechselwirkung der Salzionen untereinander aus.

Im folgenden muß das Produkt

$$f_{\pm}^* = (f_{\pm})_{el} \cdot (f_{\pm})_v \quad (27)$$

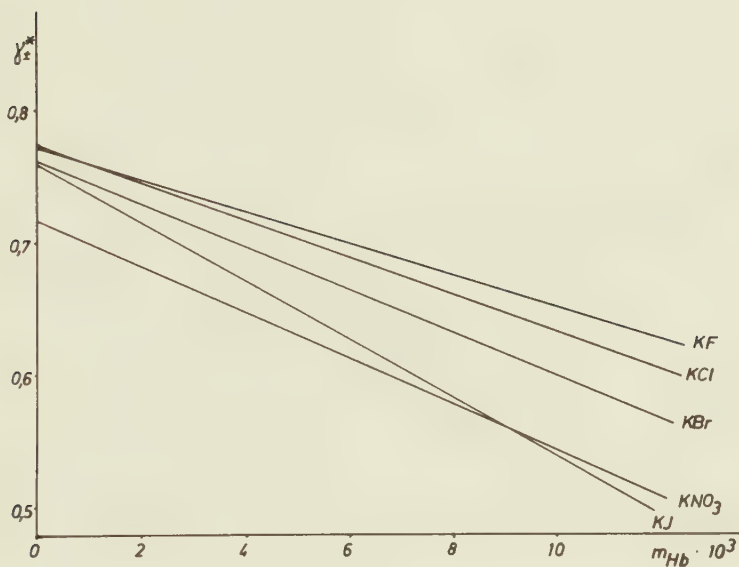


Abb. 12: Mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient nach Berücksichtigung von 0,3 g "non - solvent - water" pro Gramm Hämoglobin in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration in (Mol/kg Wasser) $\cdot 1000$. (Ausgleichsgeraden)

Gerade für KCl nach MENGES [27] miteingezeichnet.

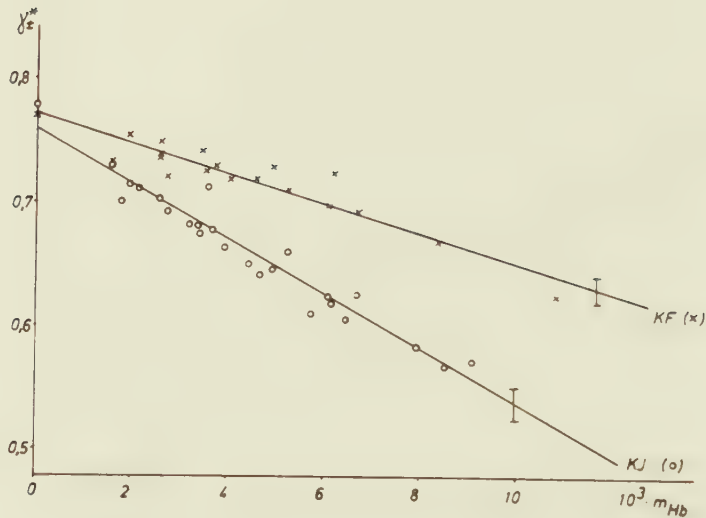


Abb. 13: wie Abb. 12, doch nur zwei Geraden (KF und KJ) mit Meßpunkten in einem Diagramm

$\bar{I}$: Fehlerbreite, die die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden anzeigt.

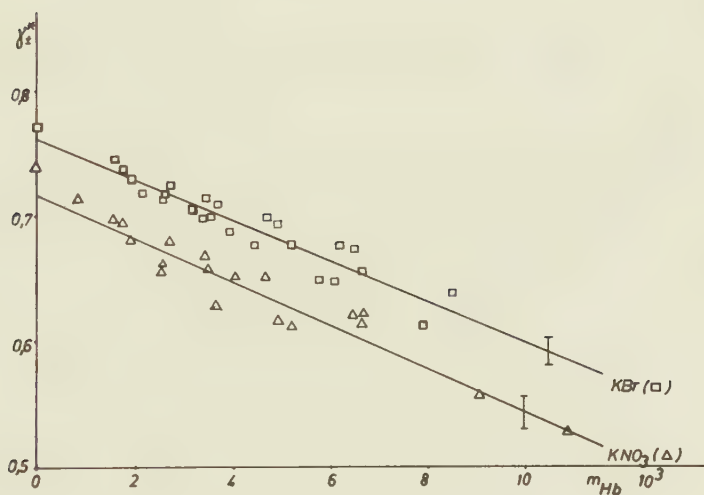


Abb. 14: wie Abb. 12, doch nur zwei Geraden (KBr und KNO₃) mit Meßpunkten in einem Diagramm

I : Fehlerbreite, die die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden angibt.

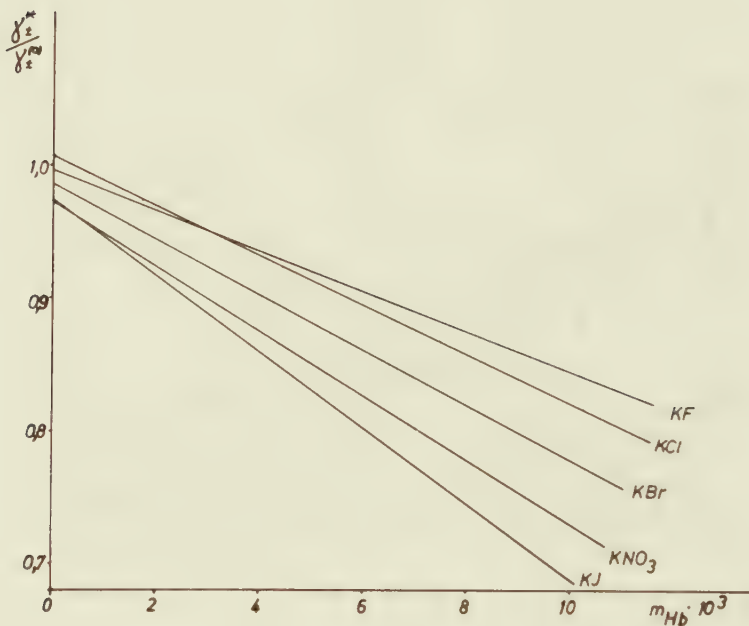


Abb. 15: Durch Division mit $\gamma_{\pm}^{(0)}$ sind die Kurven besser zu vergleichen. Es handelt sich um Ausgleichsgeraden. Der Vollständigkeit halber ist die Kurve für KCl von MENGES [27] miteingezeichnet.

betrachtet werden. Aus den Meßergebnissen ist eine getrennte Bestimmung von $(\gamma_{\pm})_{el}$ und $(\gamma_{\pm})_s$ nicht möglich. Durch Annahmen über eine der beiden Größen muß die andere jeweils aus den Meßergebnissen bestimmt werden.

3.3 Deutung der Ergebnisse als spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül

MENGES [27] versucht zuerst seine Meßwerte als Ergebnis elektrostatischer Wechselwirkung zu deuten. Auf Grund dieser Deutung seiner Ergebnisse nahm der elektrostatische mittlere Aktivitätskoeffizient in seiner Hämoglobin - KCl - Lösung um max. 20 % (in 45 %iger Hämoglobinlösung) gegenüber 0,1 molarer, reiner KCl - Lösung ab. Diese Erniedrigung des elektrostatischen mittleren Aktivitätskoeffizienten entsprach einer reinen KCl - Lösung mit einer Konzentration von etwa 1,3 Mol KCl pro kg Wasser. [10]

Durch das "non - solvent - water" wurde die molale Konzentration von KCl jedoch auf höchstens 0,13 Mol/kg "freien" Wassers erhöht.

Die Konzentrationserhöhung auf 0,13 Mol KCl pro kg "freien" Wassers hatte eine Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten von maximal 3 % zur Folge. (Bezogen auf den Wert 0,770 für $\gamma_{\pm}$, entsprechend einer 0,1 molalen KCl - Lösung bei 25° C) Die geringfügige Konzentrationserhöhung von KCl durch die Wasserbindung und die dadurch bedingte Erhöhung der elektrostatischen Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander schied also zur Erklärung der Erniedrigung der Aktivität mit zunehmender Hämoglobinkonzentration aus. Ebenso scheidet Folgendes

einfluß praktisch aus, da Hämoglobin am isoelektrischen Punkt ein Multipol ist. [30]

Zur plausiblen Erklärung seiner Ergebnisse kam er, nachdem er eine spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül annahm.

Um die Ergebnisse als spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül zu deuten, muß man wissen, ob in der Nähe des isoelektrischen Punktes überhaupt Ionen an Proteinmoleküle gebunden werden.

Mehrfach wurde die Bindung einwertiger Anionen beschrieben [48], während die Bindung von Kationen am isoelektrischen Punkt ausgeschlossen wird. Über die Bindung von Cl^- Ionen war nichts bekannt.

Der endgültige Nachweis über die spezifische Bindung von Chlorionen wurde durch TRETTER 51 in seinen pH - Messungen erbracht. Er zeigte, daß mit steigender Anionenkonzentration auch die Bindung am Hämoglobinmolekül zunahm.

In dieser Arbeit kann man feststellen, daß der Verlauf der Aktivitätskoeffizienten in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration für die einzelnen Salze verschieden ist. Die Salze selbst unterscheiden sich nur in den Anionen. Es liegt also der Schluß nahe, daß dieser unterschiedliche Effekt des Hämoglobin auf die Aktivitätskoeffizienten durch eine spezifische Bindung der Anionen am Hämoglobinmolekül zustande kommt, umso mehr, als BAUER [5] bei gleicher Versuchsanordnung, bei Salzen mit unterschiedlichen Kationen, keine signifikanten Unterschiede des Quotienten $\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$ feststellen konnte.

Die Ergebnisse werden daher als spezifische Bindung von Anionen am Hämoglobinmolekül interpretiert.

Als höchste Hämoglobinkonzentration wurden 41,29

Gewichtsprozente, entsprechend $10,904 \text{ Mol} \cdot 10^3$, erreicht. (s. Tabelle 5 für das Salz KNO_3 S.61) Durch das "non - solvent - water" wird die molale Konzentration des Salzes KNO_3 auf 0,127 Mol pro kg "freien" Wassers erhöht. Die Konzentrationserhöhung auf 0,127 Mol KNO_3/kg "freien" Wassers hat eine Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten um 3,2 % zur Folge. (Bezogen auf den Wert 0,739 für $\gamma_{\pm}^{(0)}$ entsprechend einer 0,1 molalen KNO_3 Lösung bei 25°C) Bei allen anderen verwendeten Salzen ist dieser Effekt ähnlich gering. Er kann deshalb vernachlässigt werden.

Im folgenden wird also auch [27] in dieser Arbeit für $(\gamma_{\pm})_{el}$ der mittlere Aktivitätskoeffizient $\gamma_{\pm}^{(0)}$ der reinen Salzlösung (0,1 Mol/kg Gesamtwasser) eingesetzt. Wir erhalten also aus Gleichung (27):

$$\gamma_{\pm}^* = \gamma_{\pm}^{(0)} \cdot (\gamma_{\pm})_v \quad (28)$$

Die Konzentration der Kationen im freien Wasser soll sein:

$$m_{K^+}^{(fr)} = m_{K^+}^{(w)} \quad (29)$$

während die Konzentration der Anionen

$$m_{X^-}^{(fr)} = m_{X^-}^{(w)} - \bar{\nu}_{X^-} \cdot m_{Hb}^{(w)} \quad (30)$$

beträgt, wobei $m_{K^+}^{(fr)}$, $m_{X^-}^{(fr)}$ die freie Kationen/Anionenkonzentration in Mol/kg "freien Wassers",

$m_{K^+}^{(w)}$, $m_{X^-}^{(w)}$ die stöchiometrische Kationen/Anionenkonzentration in Mol/kg "freien Wassers",
 $\bar{v}_{X^-}$ die Anzahl der im Mittel gebundenen Anionen pro Hämoglobinemolekül und
 $m_{Hb}^{(w)}$ die Konzentration von Hämoglobin in Mol/kg "freien Wassers" ist.

($\bar{v}_{X^-}$ soll unabhängig von der Hämoglobinkonzentration sein)

Unter Verwendung von Gleichung (23) folgt aus Gl. (29)

$$m_{K^+} = m_{K^+}^{(fr)} (1 - \eta_{m_{Hb}}) \quad (31)$$

und aus Gleichung (30)

$$m_{X^-} = m_{X^-}^{(fr)} \frac{(1 - \eta_{m_{Hb}})}{(1 - \bar{v}_{X^-} \frac{m_{Hb}}{m_{X^-}})} \quad (32)$$

Gleichung (31) und (32) eingesetzt in Gl. (21) ergibt Gl. (33)

$$\begin{aligned} \gamma_{\pm} &= \frac{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}}{\sqrt{m_{K^+}^{(fr)} (1 - \eta_{m_{Hb}}) m_{X^-}^{(fr)} \frac{(1 - \eta_{m_{Hb}})}{(1 - \bar{v}_{X^-} \frac{m_{Hb}}{m_{X^-}})}}} \\ &= \frac{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}}{\sqrt{m_{K^+}^{(fr)} m_{X^-}^{(fr)}}} \frac{1}{(1 - \eta_{m_{Hb}})} \sqrt{1 - \bar{v}_{X^-} \frac{m_{Hb}}{m_{X^-}}} \end{aligned}$$

Dieses Ergebnis ist unter Berücksichtigung obiger Vereinfachungen und Gleichung (28) und (26) identisch mit:

$$\begin{aligned} \gamma_{\pm} &= (\gamma_{\pm})_{el} \cdot (\gamma_{\pm})_w \cdot (\gamma_{\pm})_v = \\ &= \gamma_{\pm}^{(o)} \cdot (\gamma_{\pm})_w \cdot (\gamma_{\pm})_v \end{aligned} \quad (34)$$

Weitere Umformung ergibt:

$$(\gamma_{\pm})_v = \frac{\gamma_{\pm}^*}{(\gamma_{\pm})_w \gamma_{\pm}^{(o)}} = \frac{\gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^{(o)}} = \sqrt{1 - \bar{v}_{X-} \cdot \left(\frac{m_{Hb}}{m_{X-}} \right)} \quad (35)$$

Die graphische Darstellung der zugehörigen Kurven findet sich in Abb. 15, Seite 44. Die dazugehörigen Zahlenwerte sind den Spalten 5, der Tabellen 3 - 6, Seite 59-62, zu entnehmen.

Nach Quadrieren ergibt sich eine Geradengleichung. $(\gamma_{\pm}^* / \gamma_{\pm}^{(o)})^2$ wird in Abhängigkeit von der Konzentration (m_{Hb} / m_{X-}) aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden ist die Bindungszahl $\bar{v}_{X-}$ der Anionen am Hämoglobinmolekül.

$$\left(\frac{\gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 = 1 - \bar{v}_{X-} \cdot \left(\frac{m_{Hb}}{m_{X-}} \right) \quad (36)$$

$\gamma_{\pm}^{(o)}$ betrug für KF bei jeweils 0,1 molaler Salzkonzentration

	0.775,
für KBr	0.772,
für KNO_3	0.739 und
für KJ	0.778.

Dabei handelt es sich bei dem Wert von KF um einen extrapolierten (s. auch Seite 25) Die anderen Werte wurden der Literatur entnommen [10].

Die Steigungen $-v_X$ aus Gleichung (36) wurden rechnerisch ermittelt.

Es ergaben sich für KF	$2,73 \pm 0,29$
für KCl	$3,27 \pm 0,25$ [27]
für KBr	$3,68 \pm 0,28$
für KNO_3	$4,00 \pm 0,29$
und für KJ	$4,69 \pm 0,32$

Der Vollständigkeit halber wurde der für KCl von MENGES ermittelte Wert mit zugezogen.

Nach Berücksichtigung des "non - solvent - water" ist zu ersehen, daß die Aktivität aller vier Salze mit zunehmender Hämoglobinkonzentration abnimmt. (s. Abb 12, 13 und 14, Seite 41 bis 43)

Unterschiedlich war der Grad der Abnahme: die Kurve des KF fiel am schwächsten, die des KJ am stärksten ab.

Alle vorausgehenden Arbeiten [37, 27, 51] beschrieben eine spezifische Bindung als verantwortlich für die Aktivitätsminderung der Salze in Proteinlösungen.

TRETTNER [51] zeigte, daß es sich bei der spezifischen Ionenbindung, wie schon vermutet wurde [27], um eine Bindung der Anionen handelt.

BAUER [5], der das "Gegenstück" zu Vorliegendem bearbeitet hat, zeigte, daß bei einer Kationenreihe keine wesentliche Änderung der Aktivität in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration zu erkennen ist.

Es kann also neben der Annahme der spezifischen

Bindung auch die Annahme getroffen werden, daß Anionen gebunden werden.

Diese Arbeit hier zeigt, daß außerdem die spezifische Bindung der Anionen am Hämoglobinmolekül variiert: F^- wird am wenigsten gebunden, nämlich rund drei Ionen pro Molekül Hämoglobin, während vom J^- - Anion fünf Moleküle pro Hämoglobinmolekül gebunden werden.

Da sich die Bindungszahlen für KBr, KNO_3 und KCl dazwischen bewegen, kann angenommen werden, daß die Bindung von der Ionengröße abhängt. Tatsächlich nimmt die Ionengröße in der Reihenfolge KF, KNO_3 , KCl, KBr und KJ ab. (s. Tabelle 2, Seite 51)

Anion	Ionenradius (Stockes; Å; [28])	Bindungszahl $\bar{v}_{X^-}$
F^-	1,675	$2,73 \pm 0,29$
NO_3	1,27	$4,00 \pm 0,29$
Cl^-	1,20	$3,27 \pm 0,25$
Br^-	1,16	$3,68 \pm 0,28$
J^-	1,16	$4,69 \pm 0,32$

Tabelle 2: Vergleich der Bindungszahlen $\bar{v}_{X^-}$ mit den Anionenradien.

Eigenartigerweise weicht das Verhalten des Nitrat-anions etwas ab: die Bindungszahl entspricht etwa der des Bromidanions, der Radius ist aber größer. Möglicherweise findet das seine Klärung in dem sicher komplizierteren Bau des Nitrat-anions und einem möglichen Dipolmoment.

Erwähnenswert ist auch, daß Jodid, obgleich es gleichen Radius hat wie Bromid, wesentlich stärker gebunden wird. Wahrscheinlich handelt es sich

dabei um eine zusätzliche kovalente Bindung von Jodid, besonders an der Aminosäure Tyrosin [26]. Vom Bromidanion konnte eine solche Bindung in der Literatur nicht gefunden werden.

4. Fehlerbetrachtung

Aus den Fehlern der einzelnen Meßwerte läßt sich der Gesamtfehler der nach Gl.(21) berechneten mittleren Aktivitätskoeffizienten bestimmen.

Für den absoluten mittleren Fehler gilt allgemein:

$$\begin{aligned} \delta \gamma_{\pm}^* = & \pm \left[\left(\frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}} \right)^2 + (\delta (a_{\pm}^{IV})_{E=0})^2 \right. \\ & + \left(\frac{\delta \gamma_{\pm}}{W} \right)^2 + (\delta W)^2 \\ & + \left(\frac{\delta \gamma_{\pm}}{\delta m_{K^+}} \right)^2 + (\delta m_{K^+})^2 \\ & \left. + \left(\frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{\delta m_{X^-}} \right)^2 + (\delta m_{X^-})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (37) \end{aligned}$$

Die Größe W steht dabei für $(\gamma_{\pm})_w^{-1} = (1 - \eta_{Hb})$; (s. Gl. (25))

Für den relativen mittleren Fehler erhält man aus der Bestimmungsgleichung:

$$\begin{aligned} \frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^*} = & \pm \left[\left(\frac{\delta (a_{\pm}^{IV})_{E=0}}{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}} \right)^2 + \frac{1}{4} \left(\frac{\delta m_{K^+}}{m_{K^+}} \right)^2 \right. \\ & + \frac{1}{4} \left(\frac{\delta m_{X^-}}{m_{X^-}} \right)^2 \\ & \left. + \left(\frac{1-W}{W} \right)^2 + \left(\frac{\delta m_{Hb}}{m_{Hb}} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (38) \end{aligned}$$

Die Einzelfehler, die sich aus der Reproduzierbarkeit der Messungen ergaben, betrugen:

Für die mittlere Aktivität (s. S. 26)

$$\frac{\delta^{IV}(a_{\pm})_{E=0}}{(a_{\pm})_{E=0}^{IV}} = \pm 0,01$$

für die Kaliumkonzentration (s. S. 18)

$$\frac{\delta^{m_{K^+}}}{m_{K^+}} = \pm 0,001$$

für die Anionenkonzentration (s. S. 18)

$$\frac{\delta^{m_{X^-}}}{m_{X^-}} = \pm 0,001$$

und für die Hämoglobinkonzentration (s. S. 17)

$$\frac{\delta^{m_{Hb}}}{m_{Hb}} = \pm 0,005$$

Nach Einsetzen in die Gleichung (38) erhält man schließlich für den relativen mittleren Fehler:

$$\frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^*} = \pm 0,01$$

wobei die letzten drei Glieder in der Klammer von Gleichung (38) leicht vernachlässigt werden konnten.

Die mittlere Abweichung der Meßpunkte von den

Ausgleichsgeraden in Abb.13 und 14, S.42 und 43, beträgt für KF $\pm 0,013$; KBr $\pm 0,012$; KNO_3 $\pm 0,015$ und KJ $\pm 0,015$.

Das bedeutet eine mittlere relative Abweichung

für KF von $\pm 1,7\%$ bis $\pm 2,1\%$,

für KBr von $\pm 1,6\%$ bis $\pm 1,9\%$,

für KNO_3 von $\pm 2,0\%$ bis $\pm 2,8\%$,

und für KJ von $\pm 1,9\%$ bis $\pm 2,6\%$,

Die Fehlerabschätzung zeigt somit, daß die mittleren Aktivitätskoeffizienten von KX in der Hämoglobin - KX - Lösung unter Berücksichtigung der Fehlergrenze der Methode in guter Näherung linear von der Hämoglobin - Molalität abhängt.

Die Fehler in den γ_X - ergeben sich nach Gl. (36) als Fehler in den Steigungen der Ausgleichsgeraden. (s.S. 50) Sie betragen im Mittel $\pm 0,3$ gebundene Ionen pro Hämoglobinmolekül.

Durch obige Fehlerrechnung ist Übereinstimmung gezeigt zwischen theoretischem und tatsächlichem Fehler. Daraus kann man annehmen, daß auch für die Bindungszahlen ν_X - Übereinstimmung besteht.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der mittlere Aktivitätskoeffizient von KF, KBr, KNO_3 und KJ in konzentrierten Hämoglobinlösungen bestimmt.

Die relativ gut bekannte Zusammensetzung des Zytoplasmas des Erythrozyten diente als Vorlage für die verwendeten Lösungen. Die Salzkonzentration betrug 0,1 Mol/kg Wasser, die Hämoglobinkonzentration bis zu 41 Gew.%.

Nach Berücksichtigung von 0,3 g "non - solvent" Wasser pro Gramm Hämoglobin ergaben sich Werte für den mittleren Aktivitätskoeffizienten der vier Salze, die linear mit der Hämoglobinkonzentration abnahmen. Die Abnahme war für die verschiedenen Salze unterschiedlich, sie war aber gering: selbst bei einer Hämoglobinkonzentration von 35 Gew.%, wie sie physiologischerweise in Erythrozyten vorliegt, betrug sie für das Salz KJ nur 22 %, bezogen auf reine Salzlösung der Konzentration 0,1 Mol/l Wasser. Für die maximal erreichte Hämoglobinkonzentration von 41 Gew.% bewegte sich die Erniedrigung der Aktivitätskoeffizienten zwischen 17 % für das Salz KF und 33 % für das Salz KJ. Der größte Teil der Ionen liegt also, wie auch von Autoren anderer Arbeiten gezeigt werden konnte [37, 39, 40, 27, 51], in freier Form vor.

Es sind folgende Schlußfolgerungen zu ziehen: Der Verlauf der Aktivitätskoeffizienten in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration ist für die verschiedenen Salze verschieden. Die Salze unterscheiden sich nur durch ihre Anio-

nen. In der Arbeit von BAUER [5], der bei gleichem Versuchsaufbau Salze mit unterschiedlichen Kationen verwendet hat, kann dagegen gezeigt werden, daß sich der Verlauf der Aktivitätskoeffizienten nicht wesentlich ändert.

Man kann daher die Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül als spezifische Anionenbindung interpretieren.

Zu diesem Ergebnis ist auch TRETTER [51] mit ganz anderen Versuchsanordnungen, nämlich pH - Messungen, gekommen.

Weiterhin läßt sich feststellen, daß die Bindungszahlen der Anionen am Hämoglobinmolekül mit den Ionenradien korrelieren. Unter Mitverwendung des Ergebnisses von MENGES [27] kann man erkennen, daß mit abnehmendem Anionenradius mehr Ionen gebunden werden. Nicht in dieses Schema läßt sich das Nitrat-anion einordnen: es wird stärker gebunden als Halogenanionen ähnlicher Größe. Vermutlich läßt sich das aber mit dem komplizierteren Aufbau und einem eventuell daraus resultierenden Dipolmoment erklären. Das Jodidanion wird bei gleichem Ionenradius stärker gebunden als das Bromidanion. Hier handelt es sich eventuell um eine zusätzliche kovalente Bindung von Jodid an Tyrosin [26], über die bei Bromidanionen nichts bekannt ist.

Auf jeden Fall erhärten alle gewonnenen Ergebnisse die bisherigen Annahmen [27, 51, 5]. Da auf Grund zahlreicher Untersuchungen [31, 32-36, 8, 21, 4, 29, 19] angenommen werden darf, daß die thermodynamischen Eigenschaften des Zytoplasmas lebender Zellen nicht erheblich von denen in konzentrierten Makromolekül - Salz - Lösungen abweichen, können

die hier gewonnenen Ergebnisse übertragen werden und man kann zu der Feststellung gelangen, daß auch im Zytoplasma der größte Teil der Ionen als frei zu betrachten ist.

Tabelle 3:

$\gamma_{\pm}$, $(\gamma_{\pm})_w$, $\gamma_{\pm}^*$, $\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$, $(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$ für das

Salz Kaliumfluorid¹

$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$ (1)	$\gamma_{\pm}$ (2)	$(\gamma_{\pm})_w$ (3)	$\gamma_{\pm}^*$ (4)	$\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$ (5)	$(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$ (6)
1,540	0,755	1,031	0,733	0,946	0,895
1,924	0,784	1,039	0,755	0,974	0,949
2,534	0,778	1,052	0,740	0,955	0,912
2,535	0,775	1,052	0,737	0,951	0,904
2,572	0,789	1,052	0,750	0,968	0,937
2,681	0,762	1,055	0,722	0,932	0,869
3,413	0,795	1,071	0,743	0,959	0,920
3,520	0,780	1,073	0,727	0,938	0,880
3,686	0,787	1,077	0,731	0,943	0,889
4,019	0,781	1,084	0,720	0,929	0,863
4,639	0,791	1,099	0,720	0,929	0,863
4,902	0,808	1,105	0,731	0,944	0,891
5,181	0,790	1,111	0,711	0,918	0,843
6,044	0,792	1,132	0,699	0,902	0,814
6,144	0,824	1,135	0,726	0,937	0,878
6,655	0,798	1,148	0,695	0,897	0,805
8,357	0,800	1,193	0,671	0,866	0,750
10,796	0,793	1,264	0,627	0,809	0,654

Tabelle 4:

$\gamma_{\pm}^*$, $(\gamma_{\pm}^*)_w$, $\gamma_{\pm}^*$, $\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$, $(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$ für das

Salz Kaliumbromid

$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	$\gamma_{\pm}^*$	$(\gamma_{\pm}^*)_w$	$\gamma_{\pm}^*$	$\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$	$(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1,547	0,769	1,031	0,746	0,966	0,933
1,739	0,764	1,035	0,738	0,956	0,914
1,938	0,758	1,039	0,730	0,946	0,895
2,133	0,750	1,043	0,719	0,931	0,867
2,545	0,751	1,052	0,714	0,925	0,856
2,588	0,755	1,053	0,717	0,929	0,863
2,690	0,765	1,055	0,725	0,939	0,882
3,175	0,752	1,065	0,706	0,915	0,837
3,358	0,747	1,069	0,699	0,905	0,819
3,422	0,766	1,071	0,715	0,926	0,857
3,533	0,751	1,073	0,700	0,907	0,823
3,661	0,764	1,076	0,710	0,920	0,846
3,899	0,744	1,082	0,688	0,891	0,794
4,398	0,741	1,093	0,678	0,878	0,771
4,646	0,769	1,099	0,700	0,907	0,823
4,908	0,768	1,105	0,695	0,900	0,810
5,194	0,753	1,112	0,677	0,877	0,769
5,753	0,730	1,125	0,649	0,841	0,707
6,050	0,735	1,133	0,649	0,841	0,707
6,144	0,768	1,135	0,677	0,877	0,769
6,460	0,771	1,143	0,675	0,874	0,764
6,665	0,754	1,148	0,657	0,851	0,724
7,916	0,724	1,181	0,613	0,794	0,630
8,496	0,766	1,197	0,640	0,829	0,687

Tabelle 5:

$$\gamma_{\pm}, (\gamma_{\pm})_w, \gamma_{\pm}^*, \gamma_{\pm}/\gamma_{\pm}^{(0)}, (\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2 \text{ für das}$$

Salz Kaliumnitrat

$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	$\gamma_{\pm}$	$(\gamma_{\pm})_w$	$\gamma_{\pm}^*$	$\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$	$(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
0,824	0,724	1,016	0,713	0,965	0,931
1,545	0,720	1,031	0,698	0,945	0,893
1,737	0,719	1,035	0,695	0,940	0,884
1,930	0,707	1,039	0,681	0,922	0,850
2,542	0,696	1,052	0,662	0,896	0,803
2,579	0,692	1,053	0,657	0,889	0,790
2,688	0,717	1,055	0,680	0,920	0,846
3,419	0,717	1,071	0,670	0,907	0,823
3,529	0,706	1,073	0,658	0,890	0,792
3,652	0,666	1,076	0,619	0,838	0,702
4,060	0,708	1,085	0,652	0,882	0,778
4,644	0,719	1,099	0,654	0,885	0,783
4,906	0,682	1,105	0,617	0,835	0,697
5,190	0,683	1,112	0,614	0,831	0,691
6,460	0,710	1,143	0,621	0,840	0,706
6,662	0,683	1,148	0,595	0,805	0,648
6,671	0,695	1,148	0,605	0,819	0,671
9,066	0,676	1,213	0,557	0,754	0,569
10,904	0,671	1,267	0,529	0,716	0,513

Tabelle 6:

$\gamma_{\pm}^*$, $(\gamma_{\pm})_w$, $\gamma_{\pm}^*$, $\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$, $(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$ für das
Salz Kaliumjodid

$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	$\gamma_{\pm}$	$(\gamma_{\pm})_w$	$\gamma_{\pm}^*$	$\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)}$	$(\gamma_{\pm}^*/\gamma_{\pm}^{(0)})^2$
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1,553	0,723	1,031	0,701	0,901	0,812
1,745	0,757	1,035	0,731	0,940	0,884
1,938	0,743	1,039	0,715	0,919	0,845
2,140	0,743	1,043	0,712	0,915	0,837
2,554	0,781	1,052	0,742	0,954	0,910
2,588	0,740	1,053	0,703	0,904	0,817
2,698	0,731	1,055	0,693	0,891	0,794
3,184	0,728	1,066	0,683	0,878	0,771
3,368	0,730	1,070	0,682	0,877	0,769
3,430	0,724	1,071	0,676	0,869	0,755
3,543	0,767	1,074	0,714	0,918	0,843
3,661	0,730	1,076	0,678	0,871	0,759
3,908	0,718	1,082	0,664	0,853	0,728
4,408	0,712	1,093	0,651	0,837	0,701
4,653	0,707	1,099	0,642	0,825	0,681
4,913	0,715	1,105	0,647	0,832	0,692
5,205	0,735	1,112	0,661	0,850	0,723
5,761	0,687	1,125	0,611	0,785	0,616
6,058	0,708	1,133	0,625	0,803	0,645
6,144	0,704	1,135	0,620	0,797	0,635
6,460	0,695	1,143	0,608	0,781	0,611
6,674	0,720	1,148	0,627	0,806	0,649
7,916	0,691	1,181	0,585	0,752	0,565
8,496	0,682	1,197	0,570	0,733	0,537
9,066	0,696	1,213	0,574	0,738	0,544

6. Literaturverzeichnis

1. G.S. Adair, M.E. Adair: Proc. Roy. Soc.(London)
A90 (1947), 341
2. C.H. Amberg: J. Amer. Chem. Soc. 79
(1957), 3980
3. P. Andrews: Biochem. J. 91 (1964),
222
4. E.L. Andronikashvili, in L.P. Kayushin (Ed.)
G.M. Mrevlishvili, "Water in Biological
P.L. Privalov: Systems", übersetzt aus
dem Russ., Consultants,
New York, 1969, p.63
5. M.E. Bauer Persönliche Mitteilungen
6. J. Bernhardt Phys. Chem. 79 (1975),
584
7. H.B. Bull, K. Breese: Arch. Biochem. Biophys.
128 (1968), 488
8. W.H. Bunch, G. Kallsen: Science 164 (1969), 1178
9. C.W. Carr: Ann. N.Y. Acad. Sci.
148 (1968), 180
10. B.E. Conway: "Electrochemical Data",
Elsevier Publ. Comp.,
Amsterdam, Houston, Lon-
don, New York, 1952

11. D.J. Cox,
V.N. Schumaker: J. Amer. Chem. Soc. 83
(1968). 110
12. D; A. T. Dick: "Cell Water", Butter-
worth, London, 1966
p. 36 ff.
13. D.L. Drabkin: J. Biol. Chem. 185
(1950), 231
14. D.L. Drabkin: J. Biol. Chem. 164
(1946), 703
15. C.M. Gary-Bobo: J.Gen. Physiol. 50
(1967), 2547
16. J.H.B. George,
C.R. Schlaikjer,
R.A. Horne: J. Electrochem. Soc.
117 (1970), 892
17. E.A. Guggenheim: "Thermodynamics", North-
Holland Publ. Comp.,
Amsterdam, 1959, p.386ff.
18. E.A. Guggenheim: loc. cit.[17], p. 396 ff.
19. G. Hasl, H. Pauly: Biophysik 7 (1971), 283
20. J.A. Hinson,
Th. L. Mc Meekin: Biochem. a. Biophys.
Research Communications
35 (1969), 94, 95
21. M.J. Kushmerick,
R.J. Podolsky: Science 166 (1969), 1297

22. G.N. Ling: "A Physical Theory of the Living State; The Association-Induction Hypothesis", Blaisdell, New York, 1962.
23. G.N. Ling: Ann. N.Y. Acad. Sci. 125 (1965), 401 .
24. G.N. Ling, F.W. Cope: Science 163 (1969), 1335
25. G.N. Ling: Internatl. Rev. Cytology 26 (1969), 1
26. G.E. Means,
R.E. Teeney: Chemical Modification of Proteins, Holden-Day Inc., San Francisco 1971 p 175 ff.
27. G. Menges: Dissertation, Erlangen 1973
28. E.A. Moelwyn-Hughes Physikalische Chemie, Thieme Verlag Stuttgart 1970
29. G.M. Mrevslishvili,
P.L. Privalov: in L.P. Kayushin (Ed.) "Water in Biological Systems", übersetzt aus dem Russischen Consultants Bureau, New York, 1969, p. 63
30. J.L. Oncley: in E.J. Cohn, J.T. Edsall: "Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions", Reinhold Publ. Comp., New York, 1943 p.543

31. H. Pauly: "Thermodynamische und elektrische Eigenschaften des Zytoplasmas" in W. Beier (Ed.): "Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik", Thieme, Leipzig
32. H. Pauly: Nature, 183 (1959), 333
33. H. Pauly, H.P. Schwan: ONR Techn. Report 28, 1959, Univers. of Pennsylvania, Electromed. Lab., The Moore School of Electrical Engineering
34. H. Pauly: Biophysik 1 (1963), 143
35. H. Pauly, H.P. Schwan: Biophys. J. 6 (1966), 621
36. H. Pauly in W. Beier (Ed.): "Physikalische Grundlagen der Medizin; Abhdlgn. aus der Biophysik" Heft 7, Edition Leipzig, 1967, p.85
37. H. Pfister: Dissertation, Erlangen 1971
38. H. Pfister: Diplomarbeit, Frankfurt 1963
39. H. Pfister: Z. Naturf. 25 b (1970), 1130
40. H. Pfister, H. Pauly: J. Polym. Sci. C, NO. 39. (1972), pp.179-189
41. D. Rämisch: Persönliche Mitteilungen

42. H. Rau: Persönliche Mitteilungen
43. R.A. Robinson, "Electrolyte Solutions",
R.H. Stokes Butterworth, Scientific Publ.,
London 1959, S. 24 ff.
44. D. Rosen Trans. Farad. Soc. 59 (1963),
1211
45. G. Scatchard: J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953),
2883
46. G. Scatchard: in Shedlovsky (Ed.): "Elektro-
chemistry in Biology and Medicine",
J. Wiley & Sons, New York, 1955,
p. 18
47. K. Sollner: Ann. N.Y. Acad. Sci. 148 (1968),
154
48. J. Steinhardt, "Multiple Equilibria in Proteins",
J.A. Reynolds: Acad. Press, New York u. London,
1969 p. 214 ff., 316 ff.
49. A.S. Tombalakian, J. Phys. Chem. 70 (1966), 3711
W.F. Graydon:
50. A.S. Tombalakian: J. Phys. Chem. 72 (1968), 1566
51. N. Tretter: Dissertation, Erlangen 1975
52. A.S. Troschin: "Problems of Cell Permeability",
Pergamon Press Oxford, 1966

Herrn Professor Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas, die große materielle Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut.

Bei Herrn Dr. Pfister möchte ich mich sehr herzlich für die vorbildliche Betreuung und die immervorhandene Hilfsbereitschaft bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Angehörigen des Instituts möchte ich danken für Antwort in vielen Fragen und das gute Arbeitsklima.

An dieser Stelle danke ich auch meinen Eltern, die mir auf dem langen Weg der Ausbildung immer zur Seite gestanden sind.

Lebenslauf

Ich, Wolfgang Schmid, Sohn des Hauptschulkonrektors Hermann Schmid und seiner Ehefrau Irmingard, geborene Waas, wurde am 19.7.1950 in Schmidmühlen, Landkreis Amberg, geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Neustadt a.d. Waldnaab. Nach Abschluß der 5. Volksschulklasse trat ich im Herbst 1961 in das Keplergymnasium Weiden über. Am 20. Juni 1970 erhielt ich an dieser Schule das Zeugnis der Reife.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Am 29. Juli 1971 bestand ich an dieser Universität die naturwissenschaftliche, am 17. April 1973 die ärztliche Vorprüfung und am 3. August 1976 die ärztliche Prüfung.

Erlangen, im September 1976

Wolfgang Hermann Schmid

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990